



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN DE
LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LÁGRIMAS

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Nieves Solana, Miguel

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Director/a Experimental: CUBAS NUÑEZ, LAURA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ETSEAMN

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LÁGRIMAS

AUTOR: MIGUEL NIEVES SOLANA
DIRECTORA EXPERIMENTAL: LAURA CUBAS NÚÑEZ
TUTORA: MARÍA ADELAIDA GARCÍA GIMENO

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2022/2023

Valencia, junio de 2023



ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LÁGRIMAS por Miguel Nieves Solana se distribuye bajo [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

RESUMEN

Título: ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LÁGRIMAS

La esclerosis múltiple (EM) es la principal causa de discapacidad por enfermedad entre adultos jóvenes. En la actualidad se reconocen dos formas clínicas: la EM remitente recurrente (EMRR) y la EM progresiva (EMP), y a su vez esta última puede tener un inicio a brotes (EM secundaria progresiva, EMSP) o bien no presentar brotes sino un incremento progresivo de la neurodegeneración y consiguiente discapacidad (EM primaria progresiva, EMPP). Las formas que se inician a brotes, EMRR y EMSP, durante la fase de brotes son indistinguibles, por lo que cuando se diagnostica la progresión, lo que ocurre entre 10 y 15 años después de haber presentado el primer brote, los fenómenos degenerativos ya están muy avanzados, siendo ineficaces los tratamientos actuales. Por ello es imprescindible contar con biomarcadores que nos permitan diagnosticar la progresión en las etapas iniciales, cuando el paciente todavía está en la fase remitente-recurrente. De los diferentes biomarcadores candidatos a ayudar al diagnóstico de la progresión es la Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) la que se ha mostrado más prometedora en líquido cefalorraquídeo (LCR), sin embargo, su valor en sangre se ve contaminado por cualquier inflamación a nivel periférico. No obstante, la determinación en LCR está limitada por el método invasivo que supone una punción lumbar y la dificultad para hacer estudios seriados. En este sentido, el objetivo de este trabajo es estudiar si la CHI3L1 puede detectarse y cuantificarse en lágrimas para ver si su valor correlaciona con el obtenido en LCR, así como con la clínica del paciente. Además, estudiaremos la presencia de las bandas oligoclonales IgM (BOM) en las lágrimas, otro biomarcador de mal pronóstico utilizado como apoyo en la práctica clínica diaria. La detección de estos biomarcadores en lágrima abriría una puerta a investigar la validez clínica de este fluido biológico frente al LCR, aportando ventajas en cuanto a método de extracción y la posibilidad de repetir mediciones en el tiempo. Este trabajo se relaciona con el ODS número 3 de la Agenda 2030.

Palabras clave: CHI3L1; ESCLEROSIS MÚLTIPLE; NEURODEGENERACIÓN; LÁGRIMAS; BIOMARCADORES PROGRESIÓN

Key words: CHI3L1; MULTIPLE SCLEROSIS; NEURODEGENERATION; TEARS; PROGRESSION BIOMARKERS

Autor: Miguel Nieves Solana

Localidad y fecha: Valencia, Comunidad Valenciana, junio 2023

Tutora: Laura Cubas Núñez (IIS La Fe)

Tutora: María Adelaida García Gimeno (UPV)

Encontraré un camino, o haré uno.

- Aníbal

AGRADECIMIENTOS

A mi hermano Juan, al que quiero muchísimo y espero que pueda beneficiarse de todo este nuevo conocimiento.

A mi directora experimental Laura y a todo el laboratorio de Neuroinmunología del IIS La Fe, por permitirme realizar este TFG y por haberme enseñado todo lo que sé sobre los mecanismos patológicos de la Esclerosis Múltiple, abrirme la mente a diferentes modos de proceder en el laboratorio, y por tener tanta paciencia con mis fallos como alegría con mis aciertos.

A mis padres, Pilar y Gabriel, por haberme enseñado que con fuerza y empeño todo es alcanzable, por apoyarme incondicionalmente y por animarme cuando no veía la luz al final del túnel.

A mis hermanas Pilar y Candela, por nunca dudar de mí y quererme incluso en mis peores momentos.

A Marta y Alejandro, por aconsejarme y saberme llevar, y por hacerme ver lo que a veces no puedo o no quiero ver.

Al resto de mis amigos y de mi familia: os quiero mucho y gracias por todo lo que habéis hecho siempre por mí.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	1
1.2	FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD	1
1.3	BIOMARCADORES EN LA EM	3
1.3.1	Citoquinas y quimiocinas.....	3
1.3.2	Cadena ligera del neurofilamento	3
1.3.3	Bandas oligoclonales.....	5
1.3.4	CHI3L1	5
1.4	LA LÁGRIMA COMO MÉTODO NO INVASIVO PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES	7
2	OBJETIVOS.....	9
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1	SELECCIÓN DE PACIENTES	10
3.2	OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LÁGRIMAS	11
3.2.1	Método de extracción con suero fisiológico.....	11
3.2.2	Método de extracción de lágrima pura	11
3.3	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CHI3L1 EN LÁGRIMAS.....	12
3.3.1	Western blot.....	12
3.3.2	ELISA.....	13
3.4	DETECCIÓN DE BOM	14
3.4.1	Puesta a punto del protocolo de isoelectroenfoque (IEF) en lágrimas.....	14
3.4.2	Protocolo de electroforesis de IEF	14
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
4	RESULTADOS	15
5	DISCUSIÓN.....	20
6	CONCLUSIONES	23
7	REFERENCIAS	24
8	ANEXOS.....	39
8.1	ANEXO I.....	39
8.2	ANEXO II	39
8.2.1	Protocolo Western blot.....	39
8.2.2	Protocolo ELISA	39
8.2.3	Protocolo IEF para detección de BOM.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AMCase – Quitinasa ácida de mamíferos
AQP4 – Acuaporina 4
BHE – Barrera hematoencefálica
BOC – Bandas oligoclonales
BOM – Bandas oligoclonales Ig-M
CHI3L1 – Chitinase 3-like 1
CHIT1 – Quitotriosidasa
DIT – Diseminación en el tiempo
EDSS – Escala expandida del estado de discapacidad
ELA – Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EM – Esclerosis Múltiple
EMCD – Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida
EMPP – Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
EMRR – Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EMSP – Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
IEF – Electroforesis de isoelectroenfoque
LCR – Líquido cefalorraquídeo
MCT – Tubos microcapilares
NfH – Neurofilamento pesado
NfL – Cadena ligera del neurofilamento
NfM – Neurofilamento intermedio
NMO – Neuromielitis Óptica
PCTF – Película de lágrima precorneal
RMN - Resonancia magnética nuclear
SAMS – *Single Attack Multiple Sclerosis*
SCA - Síndrome Clínico Aislado
SNC – Sistema nervioso central
SRA - Síndrome Radiológico Aislado
STS – Tiras Schirmer
TME – Terapia modificadora de enfermedad

1 INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y autoinmune, con afectación a nivel de sistema nervioso central (SNC). La EM actualmente ocupa el segundo lugar entre los adultos jóvenes en términos de frecuencia de discapacidad, justo por detrás de los accidentes automovilísticos. El intervalo de edad más común durante el que se produce el inicio comprende los 25 y los 35 años (Kobelt et al., 2017). La EM se posiciona como la enfermedad autoinmune crónica de afectación neurológica más frecuente en países desarrollados (Noseworthy et al., 2000; Pugliatti et al., 2006).

El encéfalo (cerebro, troncoencéfalo y cerebelo) y la médula espinal son las partes que constituyen el SNC. Su funcionalidad está íntimamente relacionada con la forma en la que el organismo percibe los estímulos externos, con la forma en la que integra y procesa la información, y con la forma en la que desarrolla respuestas para interactuar con el entorno. Las neuronas, que son células especializadas del SNC, realizan estas tareas.

Las neuronas transmiten información a través de los axones, que son prolongaciones nerviosas recubiertas por vainas de mielina. La mielina es un lípido que se encarga del aislamiento y de la optimización de la transmisión de impulsos nerviosos.

En la EM, tienen lugar diferentes reacciones aberrantes en el sistema inmunológico que ocasionan la destrucción de la mielina. Esta desaparición de la mielina provoca alteraciones en la transmisión nerviosa, que provoca el surgimiento de síntomas de distinta índole: trastornos visuales, fatiga, pérdida de equilibrio y/o coordinación, alteración sensitiva o motora, disfunción de esfínteres, etcétera. La EM es una enfermedad de carácter heterogéneo que está mediada por fenómenos inflamatorios a consecuencia de un mal funcionamiento de los mecanismos de autoinmunidad (mediada por la acción de células T activadas, linfocitos B y células del sistema inmune innato).

Se cree que la etiología de la enfermedad surge de una compleja interacción entre diferentes factores genéticos y ambientales (Yamout y Alroughani, 2018), llegando incluso algunos ensayos recientes a vincular la etiología de la enfermedad con el virus de Epstein-Barr (Bjornevik et al., 2022).

1.2 FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La mayor parte de los pacientes que padecen EM presentan episodios inflamatorios focales y agudos, denominados “brotes”, seguidos posteriormente en el tiempo de una recuperación parcial o casi total. Un brote viene definido por la repentina aparición o empeoramiento de la sintomatología por el daño en el SNC (Lublin y Reingold, 1996; Miller et al., 2005). También puede tener lugar un proceso neurodegenerativo en el que la progresión de la discapacidad es constante, sin existir evidencias de ninguna inflamación aguda o de brotes.

En las fases inflamatorias de la enfermedad (asociadas a brotes), se cree que el sistema inmune adaptativo (linfocitos T y B) juega un papel más destacable, mientras que en las fases progresivas cobran más importancia las células del sistema inmune innato (Gandhi et al., 2010; Du et al., 2017). Se distinguen diferentes subtipos de EM en función de cómo se manifieste la enfermedad.

La EM remitente-recurrente (EMRR) es la forma clínica más frecuente (afecta al 85-90% de los pacientes con EM) (Figura 1). Avanza a través de brotes que vienen seguidos por una recuperación total o parcial, así como por la presencia de inflamación. Cuando se detectan lesiones típicas de la sustancia blanca del SNC en la resonancia magnética nuclear (RMN), pero el paciente es asintomático, la afección se denomina síndrome radiológico aislado (SRA). Un primer episodio de brote se denomina síndrome clínico aislado (SCA) si no cumple con los criterios de diagnóstico de McDonald de 2017 (Thompson et al., 2018). Se consideraría que se ha producido un único ataque de EM, también conocido como SAMS (*Single Attack Multiple Sclerosis*), si se cumplieron los criterios de EM durante el brote inicial o si se confirmó el diagnóstico durante el seguimiento, pero no se produjeron brotes adicionales (Zeydan y Kantarci, 2018).

Existen dos tipos de esclerosis múltiple progresiva (EMP). Por un lado, está la forma clínica primaria progresiva (EMPP), que afecta al 10-15% de los pacientes (Tullman et al., 2004), y se distingue por una progresión sostenida de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad (Figura 1). También existe la forma clínica secundaria progresiva (EMSP), que inicialmente se presenta como EMRR (en aproximadamente 35-40% de los casos), pero luego tiene lugar un período de neurodegeneración y progresión de la discapacidad, independiente de los brotes. Existe desacuerdo acerca de si estas formas exhiben neurodegeneración y progresión subclínica desde el inicio; por lo tanto, el término esclerosis múltiple progresiva de inicio rápido (*Bout-Onset Progressive Multiple Sclerosis*) se ha desarrollado en estas circunstancias.

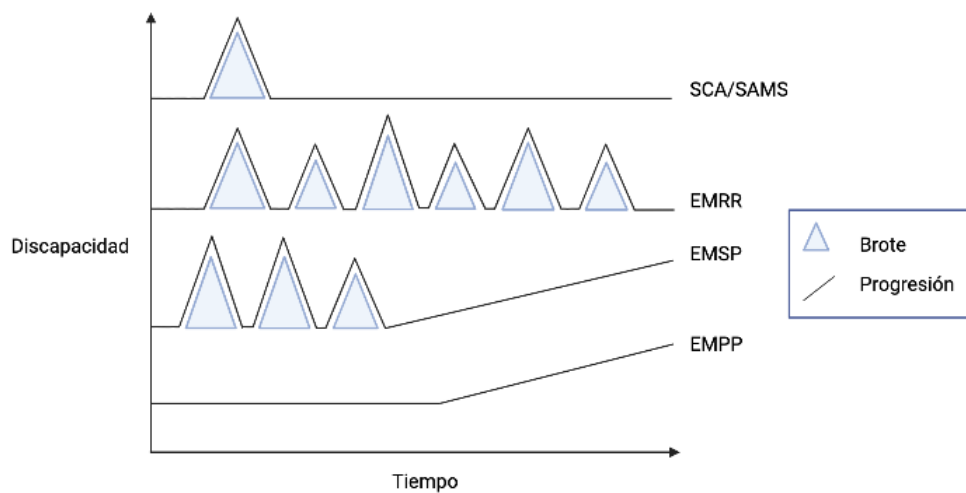


Figura 1. Formas clínicas de EM. Gráfico obtenido con www.biorender.com

Durante mucho tiempo se tuvo la concepción de que la neuritis óptica era un síntoma generado mayoritariamente a consecuencia de la EM.

Investigaciones recientes han revelado que existen en el ser humano causas más infrecuentes y peligrosas de neuritis óptica, como la enfermedad de Devic o neuromielitis óptica (NMO) (Shumway et al., 2023).

La NMO se caracteriza por episodios de neuritis óptica aguda y mielitis transversa. El mecanismo patogénico de este síndrome clínico puede explicarse por el hecho de que la proteína canalizadora de agua más prevalente del SNC, la acuaporina 4 (AQP4), es una diana de autoanticuerpos Ig-G presentes en el suero de la mayoría de los pacientes (Jarius et al., 2020).

1.3 BIOMARCADORES EN LA EM

La EM muestra una gran heterogeneidad a nivel clínico. Por ello, la enfermedad en cada paciente debe definirse con precisión para permitir diagnósticos y pronósticos exactos. Es también crucial la posibilidad que brindan los biomarcadores para realizar evaluaciones personalizadas de las respuestas terapéuticas, así como del riesgo individual a sufrir determinados efectos secundarios. Los biomarcadores más relevantes y prometedores en EM han sido obtenidos durante los últimos años de fluidos como el suero sanguíneo y el LCR (Ziemssen et al., 2019).

1.3.1 Citoquinas y quimiocinas

Numerosos estudios han destacado la presencia de inflamación en la EM y su estrecha relación con el incremento de los niveles de citocinas y quimiocinas, proteínas implicadas en la atracción y activación de células inflamatorias (linfocitos y macrófagos, entre otros) (Sellebjerg et al., 2009; Berghmans et al., 2012; Matsushita et al., 2013). IL-12p40, IP-10, CCL5, CXCL13, CCL3, CCL4 e IL-8 son ejemplos de citoquinas asociadas con la respuesta de tipo Th1. Estas citoquinas se han encontrado significativamente elevadas en etapas específicas de la enfermedad (Pranzatelli et al., 2008). Se encontró además una disminución sostenida en las concentraciones de citoquinas relacionadas con la respuesta de tipo Th2 (IL-5, MCP-1, IL-13, IL-10, IL-4) (Matsushita et al., 2013).

El papel desempeñado por las quimiocinas en el reclutamiento y la migración de las células del SI a través de la barrera hematoencefálica (BHE) también se ha investigado en varios estudios. En la sangre y en el LCR de pacientes de EM con actividad inflamatoria, se han descubierto niveles elevados de quimiocinas como Mig/CXCL9 e IP-10/CXCL10 (Franciotta et al., 2006). RANTES/CCL5 también se ha detectado en niveles elevados, y su concentración aumenta durante los brotes (Bartosik-Psujek y Stelmasiak, 2005). Además, la investigación sobre los receptores de estas quimiocinas (CXCR3, CCR5 y RANTES) ha demostrado que los pacientes con formas progresivas y recurrentes tienen niveles más altos de estos receptores en sus células sanguíneas periféricas (Mahad y Ransohoff, 2003; Balashov et al., 1999). La concentración de algunas quimiocinas, como MCP-1/CCL2, por otro lado, tiende a disminuir cuando ocurre un brote (Bartosik-Psujek y Stelmasiak, 2005; Franciotta et al., 2006).

1.3.2 Cadena ligera del neurofilamento

Los neurofilamentos son proteínas de carácter fibroso que se encuentran englobadas en la familia de los filamentos intermedios.

Realizan funciones de soporte estructural y son un componente destacado del citoesqueleto de las neuronas, especialmente en los axones. Constan de tres subunidades: la cadena ligera de neurofilamento (NfL), el neurofilamento intermedio (NfM) y el neurofilamento pesado (NfH) (Lycke et al., 1998).

Estos neurofilamentos se pueden utilizar con el fin de detectar y controlar el daño axonal y la muerte neuronal, ya que se liberan en el LCR cada vez que existe daño neuronal. La subunidad más útil en la descripción de la EM es la NfL. Aunque esta cadena no se considera un biomarcador específico para ninguna enfermedad, los pacientes con diversas enfermedades neurológicas tienen concentraciones más altas de esta en el plasma y en el LCR (Abdo et al., 2007; Blennow et al. 2012), e incluso alcanza valores que son uno o dos órdenes de magnitud superiores en enfermedades que se basan exclusivamente en la neurodegeneración, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o la enfermedad de Alzheimer (Gaiottino et al., 2013).

Debido al hecho de que las concentraciones de NfL son significativamente superiores durante los brotes, su presencia en LCR y suero es útil para detectar la actividad inflamatoria en la EM (Sellebjerg et al., 2017). La aparición de lesiones con realce de contraste en la RMN coincide con el incremento en los niveles de NfL (Lim et al., 2005; Teunissen et al., 2009; Kuhle et al., 2011), y permite la predicción de la conversión de SCA a EM clínicamente definida (EMCD) (Disanto et al., 2017; Novakova et al., 2018). La cantidad de daño axonal agudo y los niveles de NfL liberados están directamente correlacionados y, como resultado, proporcionan una gran cantidad de información acerca de la gravedad de los brotes y, en consecuencia, de las secuelas y de la discapacidad que producirán (Norgren et al., 2004; Kuhle et al., 2011; Modvig et al., 2016). En comparación con los controles, los niveles basales de NfL son más altos en los pacientes con EMRR y SAMS (Kuhle et al., 2011; Fialova et al. 2013). De hecho, niveles altos de NfL al inicio de la enfermedad se asocian con una mayor duración de la discapacidad además de con un mayor grado de atrofia cerebral y medular (Petzold et al., 2016; Kuhle et al., 2017; Barro et al., 2018).

Este biomarcador puede emplearse con el fin de controlar la respuesta a diferentes tratamientos modificadores de enfermedad (TME), puesto que ya se ha demostrado que los niveles de NfL se reducen gracias a los tratamientos que controlan procesos inflamatorios (Nováková et al., 2017; Cai y Huang, 2018; Siller et al., 2019). Además, la cuantificación de NfL presenta un carácter valioso en la detección de respuestas no óptimas a tratamientos, por lo que se hace posible la modificación de estos para mejorar los resultados (Kuhle et al., 2019).

En la actualidad, nuevas tecnologías con sensibilidad aumentada han permitido que la cuantificación de NfL en suero, donde su concentración es menor que en LCR, sea posible. De hecho, se ha encontrado la presencia de correlación entre la cantidad de NfL en suero y en LCR (Kuhle et al., 2016; Novakova et al., 2017; Hendricks et al., 2019). La cuantificación en suero presenta la ventaja de ser mucho menos invasiva para el paciente que la cuantificación en LCR, y mucho más estandarizable en la práctica clínica diaria. Por ello, se considera un biomarcador potencial de actividad con valor pronóstico en el curso de la EM (Disanto et al., 2017; Kuhle et al., 2017), además de estar estrechamente relacionado con el incremento de atrofia cerebral y medular (Barro et al., 2018) y el aumento en la escala de discapacidad (Manouchehrinia et al., 2020).

1.3.3 Bandas oligoclonales

La detección de bandas oligoclonales (BOC) Ig-G en el LCR constituye el primer biomarcador descrito para pacientes con EM (Kostulas et al., 1987). Más del 90% de los pacientes con EM presentan síntesis intratecal de la inmunoglobulina Ig-G (Álvarez-Cermeño y Villar, 2013). Por ello, su presencia en LCR y su ausencia en suero brinda información para el diagnóstico de EM, además de una mayor probabilidad de conversión de SCA a EM clínicamente definida (EMCD) (Link y Huang, 2006; Giannetti et al., 2014). A pesar de que este biomarcador no es específico para la EM, es de gran utilidad a la hora de efectuar un diagnóstico y forma parte de los criterios de diseminación en el tiempo (DIT) de la última actualización (Thompson et al., 2018).

En el LCR del 40% de los pacientes con EM, aparece otro tipo de BOC además de aquellas de Ig-G. Estas BOC están formadas por Inmunoglobulinas Ig-M, por lo que reciben el nombre de BOC-Ig-M (BOM). La presencia de este tipo de BOC indica una mayor agresividad en el curso de la enfermedad. En EMRR, la existencia de BOM en LCR presenta correlación significativa con una respuesta deficiente al TME estándar con interferón. También correlaciona con un mayor nivel de lesiones en RMN, con una alta tasa de brote, con una mayor pérdida de volumen cerebral a través del tiempo, y con más discapacidad neurológica. La presencia de este biomarcador también implica un mayor riesgo de conversión de EMRR a EMSP, y ayuda a identificar a un subgrupo de pacientes con EMPP que presentan un fenotipo que padece de niveles superiores de inflamación (Villar et al., 2002; Villar et al., 2003; Villar et al., 2005; Boscá et al., 2010; Magraner et al., 2012; Ozakbas et al., 2017).

1.3.4 CHI3L1

La familia de quitinasas representa un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de la quitina. La quitina representa al segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, y se encuentra principalmente en las paredes celulares de los hongos además de en los exoesqueletos de los insectos (Lee et al., 2011).

A pesar de que los mamíferos carecen de quitina, se han hallado niveles elevados de quitinasas en ellos, de las que únicamente dos poseen actividad enzimática: la quitotriosidasa (CHIT1) y la quitinasa ácida de mamíferos (AMCase) (Perrakis et al., 1994; Sun et al., 2017). El resto, las llamadas lectinas similares a quitinasas, carecen de actividad enzimática a pesar de preservar la hendidura de unión a sustrato. Dentro de este grupo se puede encontrar a la Chitinase 3-like 1 (CHI3L1), también conocida como YKL-40. Es una glicoproteína de 40 kDa, con función aún desconocida, pero que presenta relación con diversos procesos patológicos. Se trata de una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular es capaz de escindirse (Recklies et al., 2002) y unirse a un receptor celular o ligando soluble todavía desconocido (Johansen, 2006). Se ha descrito la expresión de CHI3L1 por diversos tipos celulares: macrófagos (Rehli et al., 2003), neutrófilos (Volck et al., 1998), condrocitos (Hakala et al., 1993), células sinoviales (De Ceuninck et al., 2001), células hepáticas (Johansen, 2006), células epiteliales del colon (Mizoguchi, 2006), células vasculares del músculo liso (Shackelton et al., 1995), entre otros.

La función fisiológica de la CHI3L1 en humanos todavía se desconoce. Sin embargo, su presencia está asociada con niveles de inflamación, remodelación del tejido extracelular, fibrosis, progresión y diseminación del cáncer (Kazakova y Sarafian, 2009; Ober et al., 2008).

Se ha demostrado la presencia de niveles significativamente elevados de CHI3L1 en la sangre de pacientes que sufren de numerosas patologías inflamatorias crónicas, como cirrosis, asma, dermatitis, diabetes, cáncer y artritis reumatoide (HogenEsch et al., 2006; Mizoguchi, 2006; Rathcke et al., 2006; Chupp et al., 2007; Kawada et al., 2008).

Asimismo, en diversas enfermedades que afectan al SNC, como el Alzheimer, la EM, el Parkinson y el ELA, también se han encontrado niveles elevados de CHI3L1, esta vez en el LCR (CHI3L1LCR), que correlacionan en todos los casos con un mal pronóstico (Hall et al., 2016; Sanfilippo et al., 2017; Janelidze et al., 2018; Quintana et al., 2018; Thompson et al., 2019; Vu et al., 2020). En Alzheimer, la CHI3L1 se expresa en el cerebro y su presencia está asociada tanto a la neuroinflamación (Querol-Vilaseca et al., 2017), como a la neurodegeneración (Alcolea et al., 2015). En Parkinson, se ha asociado con el deterioro cognitivo (Hall et al., 2016). En el caso del ictus isquémico agudo, existe una relación proporcional entre los niveles séricos de CHI3L1 y la cantidad de daño cerebral (Park et al., 2012). Se cree que, en numerosas enfermedades neurodegenerativas, la secreción de CHI3L1 por parte de los astrocitos y de la microglía activada podría acelerar la infiltración de macrófagos hacia la lesión, la angiogénesis, y la muerte neuronal asociada a la neuroinflamación (Bonneh-Barkay et al., 2012). No obstante, todavía se desconoce el mecanismo de la interacción astrocito-microglía, además del papel de la CHI3L1 en este proceso.

Aunque aún no se han identificado los receptores celulares que median los efectos biológicos de la CHI3L1, algunos estudios consideran que su expresión podría estar regulada por varias citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IFN- γ , IL-1 β y TNF- α (Ling y Recklies, 2004), que se liberan gracias a la activación constitutiva del NF- κ B. Este factor de transcripción desempeña un papel importante en el inicio y progresión de la inflamación y está regulado al alza en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas. A su vez, la CHI3L1 induce la activación del NF- κ B, retroalimentando positivamente la perpetuación de la inflamación (Di Rosa y Malaguarnera, 2016).

La expresión de CHI3L1 no está restringida al SNC, pero su presencia en el LCR en EM se ha relacionado con una secreción endógena por células gliales, como astrocitos (Bonneh-Barkay et al., 2008; Bonneh-Barkay et al., 2012; Canto et al., 2015; Llorens et al., 2017) y/o microglía/monocitos (Rehli et al., 2003; Bonneh-Barkay et al., 2008; Bonneh-Barkay et al., 2012; Canto et al., 2015). Además, estudios recientes demuestran la presencia de CHI3L1 en astrocitos reactivos situados en lesiones cerebrales de pacientes con EM (Cubas et al., 2021).

Existe correlación entre los niveles elevados de CHI3L1 en LCR y el riesgo de conversión de SCA a EMCD (Comabella et al., 2010; Hinsinger et al., 2015), gran avance o progresión de la enfermedad (Canto et al., 2012; Mane-Martinez et al., 2016; Sellebjerg et al., 2017), aumento de la discapacidad (Canto et al., 2012; Hinsinger et al., 2015; Pérez-Miralles et al., 2020) y deterioro cognitivo (Quintana et al., 2018). Del mismo modo que ocurre con NfL, los niveles de CHI3L1 disminuyen en respuesta a TME en EMRR (Malmeström et al., 2014; Nováková et al., 2017). Existe poca información sobre la relación entre los niveles de CHI3L1 y NfL de LCR en la EM, pero niveles elevados de ambos biomarcadores en este fluido se han asociado a un mayor deterioro cognitivo en etapas tempranas de la enfermedad (Quintana et al., 2018), así como a un mayor riesgo de conversión de EMRR a EMSP (Gil Perotín et al., 2021).

1.4 LA LÁGRIMA COMO MÉTODO NO INVASIVO PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES

Uno de los aspectos más importantes en la búsqueda de biomarcadores es la selección adecuada del material biológico. El tipo de material utilizado, la manera de obtenerlo y la forma de almacenarlo tienen un impacto significativo en la sensibilidad y fiabilidad del resultado analítico. La sangre, las biopsias y el LCR se consideran muestras invasivas, mientras que la saliva, la orina, el sudor y las lágrimas se consideran muestras no invasivas (Chojnowska et al., 2018; Wóznia et al., 2019; Pieragostino et al., 2019).

La elección del material biológico depende de la facilidad de obtención y de su utilidad en el estudio. Un material que es obtenido de forma no invasiva y que no implica la existencia de efectos negativos es preferido por los pacientes.

En un estudio llevado a cabo por Quah et al. en 2014, se evaluaron las preferencias de los pacientes sobre tres métodos de obtención de material biológico diferentes. Se compararon así la extracción de sangre mediante punción venosa antecubital y la prueba de punción en el dedo con la extracción de lágrimas mediante tiras de Schirmer (STS). El estudio descubrió que el 74% de los participantes prefería donar lágrimas antes que sangre para las pruebas, lo que confirma que la recogida de lágrimas con STS es un procedimiento muy aceptado y con aplicabilidad en el cribado sanitario primario (Quah et al., 2014).

La película lagrimal está diseñada con el fin de cubrir y lubricar la superficie ocular. Es esencial para proteger a los ojos del entorno, preservar la salud de la conjuntiva y de la córnea avascular, y mantener una textura superficial lisa para la correcta refracción de la luz. La película lagrimal tiene un volumen aproximado de 3 a 10 μ l, un grosor de 3 μ m, y es segregada a una velocidad de 1 a 2 μ l/min.

Las lágrimas humanas están compuestas por proteínas, a una concentración que oscila entre 6 y 11 mg/ml, siendo la más abundante la lisozima (1 mg/ml) (Zhou y Beuerman, 2017), y también por péptidos, lípidos, metabolitos, electrolitos, carbohidratos, sales, aminoácidos, nucleósidos y vitaminas.

Existen tres tipos diferentes de lágrimas, que presentan perfiles bioquímicos únicos. Las **lágrimas basales** se encuentran presentes en la superficie ocular, aportando nutrientes, manteniendo los niveles de humedad y eliminando los residuos de la superficie.

Las **lágrimas reflejas** son aquellas que se liberan en respuesta a sustancias irritantes, como químicos y cuerpos extraños. Las lágrimas reflejas se producen en mayor cantidad que las lágrimas basales y participan en la eliminación de irritantes de la superficie ocular (Chang y Purt, 2022).

Existe un tercer tipo de lágrima, producida en respuesta a una emoción, por lo que reciben el nombre de **lágrimas emocionales**. Estas presentan una composición química diferente a las lágrimas basales y reflejas (Murube, 2009). Algunos componentes de la película lagrimal, como la lactoferrina, la lipocalina-1 y la lisozima, permanecen relativamente constantes entre los distintos tipos de lágrimas. Sin embargo, la cantidad total de proteínas, lípidos e Ig-A secretora varía entre los distintos tipos; el contenido de proteínas y lípidos es mayor en las lágrimas basales (Chang y Purt, 2022). La composición de los tres tipos de lágrimas puede observarse en la Figura 2.

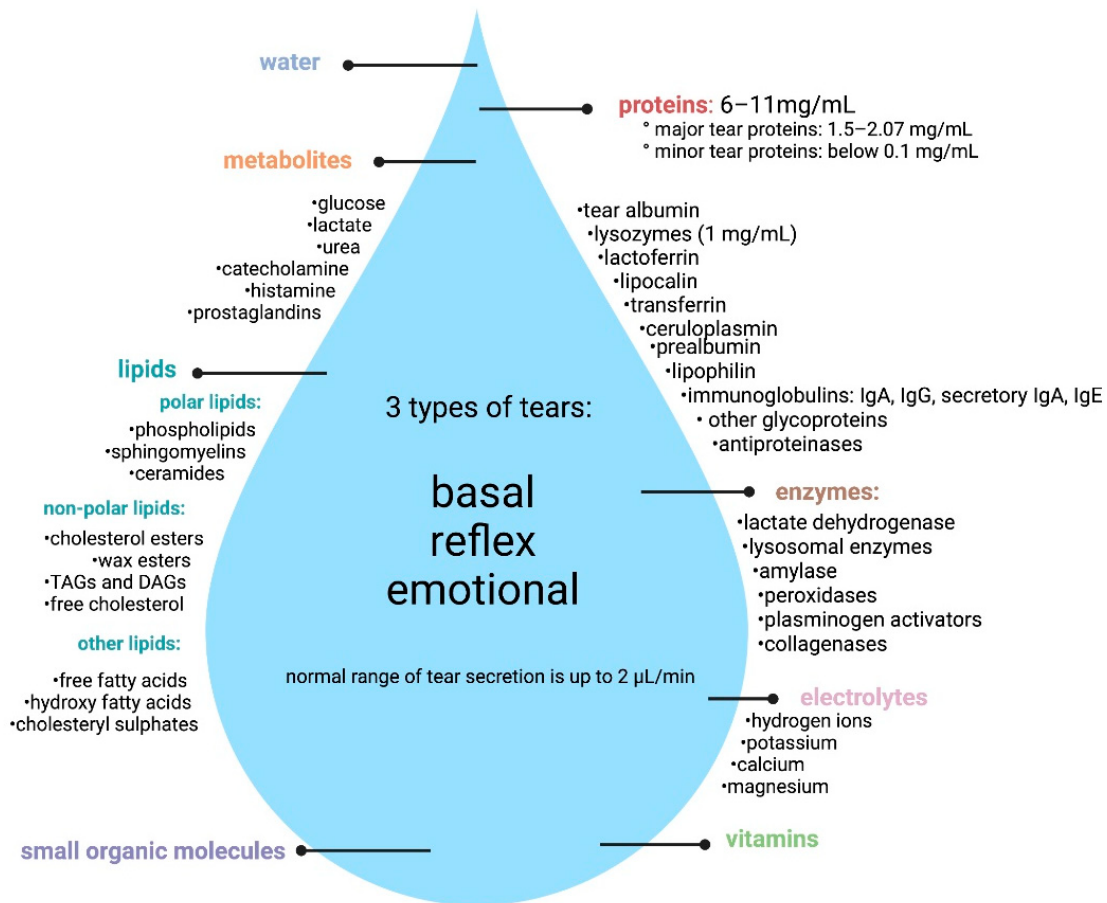


Figura 2. Composición bioquímica de las lágrimas (Król-Grzymała et al. 2022).

Existen diferentes métodos para la recogida de lágrimas, entre los que se encuentran los métodos directos y los indirectos. Los directos incluyen técnicas como la recolección mediante tubos microcapilares (MCT) y micropipetas, mientras que los indirectos están basados en la recolección mediante superficies de carácter absorbente que requieren de una posterior centrifugación, como las STS o los discos de papel de filtro. Cada metodología presenta unas ventajas y unos inconvenientes característicos frente a las otras. De este modo, los métodos directos frecuentemente necesitan de la instilación de las muestras y requieren la previa estimulación ocular. Por otra parte, la utilidad de los métodos indirectos radica en que el volumen de muestra recogido es superior, con la desventaja de que pueden causar secreción lagrimal debido al reflejo de irritación generado en la superficie ocular (Rentka et al., 2017). Se ha demostrado que, independientemente del método empleado para recoger las lágrimas, es de vital importancia evitar la activación de los nervios corneales para no producir la inducción de lágrimas reflejas, ya que como presentan diferencias en el perfil proteico, es posible que la cuantificación no represente de forma eficaz la realidad (Król-Gryzmala et al., 2022).

Hasta ahora, se han utilizado en la investigación de biomarcadores en lágrima, una amplia gama de técnicas instrumentales. Entre estas se encuentran: la electroforesis (Soria et al., 2013; Versura et al., 2010), la espectrofotometría (Nichols y Green-Church, 2009), los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) (Acera et al., 2008; Seifert et al., 2012), los microarrays (Soria et al., 2013) y las pruebas basadas en microesferas (Sonoda et al., 2006; Enríquez-de-Salamanca et al., 2010).

El potencial del uso de lágrimas como material biológico se ve impulsado por la sencillez de obtención de estas. Yendo más allá, son muy interesantes en el campo de la neurología por su relación intrínseca con el SNC (Pieragostino et al., 2019; Barmada y Shippy, 2020), ya que son consideradas un fluido intermedio entre el LCR y el suero (Cicalini et al., 2019). Se demostró que las proteínas presentes en el LCR estaban también presentes en las lágrimas (Pieragostino et al., 2019), con estudios muy recientes encontrando niveles significativos de beta-amiloide en lágrimas de pacientes con Alzheimer (Gharbiya et al., 2023).

Como consecuencia, las lágrimas poseen un carácter prometedor en la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico precoz, no invasivo y no costoso de las enfermedades del sistema nervioso. Las enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la disfunción progresiva de las estructuras centrales o periféricas del sistema nervioso, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la EM son solo unos cuantos ejemplos de enfermedades en las que el diagnóstico precoz es esencial, y en las que además es necesaria la aparición de biomarcadores más novedosos (Börger et al., 2015; Örnek et al., 2015; Frisoni et al., 2017; Ziemssen et al., 2019; Paul et al., 2019; Nandi et al., 2021).

La mayoría de los estudios realizados acerca de las proteínas lagrimales en la EM se centraron en la exploración de las BOC-Ig-G (Hümmert et al., 2019), que tienen la capacidad de reflejar el estado del microambiente del SNC (Salvisberg et al., 2014; Pieragostino et al., 2019). Dos estudios demostraron que pueden detectarse BOC-Ig-G tanto en las lágrimas como en el LCR de pacientes con EM, pero no mejoraba la fiabilidad del LCR debido a la presencia de falsos negativos (Coyle et al., 1987; Mavra et al., 1990; Lolli et al., 2019). Ahora bien, la detección de BOC-Ig-G, aunque presenta un alto valor informativo a la hora del diagnóstico, no aporta información pronóstica que ayude en la determinación de la forma clínica, al estar presentes en un 95% de los pacientes. Por otro lado, de la existencia de BOM en lágrimas de pacientes con EM no se han encontrado evidencias previas, salvo en un estudio en el que se detectan estas bandas en pacientes con deficiencia de Ig-A (Kuizenga et al., 1990).

Es necesario ampliar y focalizar la búsqueda hacia otro tipo de biomarcadores cuantificables en lágrima que ofrezcan una predicción fiable y que, por ello, sean de utilidad a la hora de efectuar bien el diagnóstico de una forma clínica bien el pronóstico de la enfermedad y puedan ayudar a establecer una pauta de tratamiento.

2 OBJETIVOS

- Objetivo 1: Optimización del método de extracción de lágrima.
- Objetivo 2: Detección y cuantificación de CHI3L1 en lágrima de pacientes con las diferentes formas clínicas de EM.
- Objetivo 3: Estudio de la correlación entre los niveles de CHI3L1 en lágrima y en LCR, así como de la estabilidad en el tiempo de los niveles de CHI3L1.
- Objetivo 4: Detección de bandas oligoclonales Ig-M en lágrima.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Todos los pacientes seleccionados fueron atendidos en las consultas de Neurología del Hospital Universitario y Politécnico de Valencia y firmaron un consentimiento informado para participar en este estudio. Se excluyeron del estudio los pacientes que presentasen sensibilidad o alguna patología a nivel ocular. Los pacientes se dividieron en 3 grupos:

- **Pacientes para el estudio de CHI3L1 en lágrima (Tabla 1):** pacientes con diagnóstico de EM definida por los criterios de McDonald 2017, distribuidos en las siguientes formas clínicas: EMRR (23 pacientes), EMSP (16 pacientes), EMPP (9 pacientes). Debían cumplir además los siguientes criterios:
 - Estar en tratamiento con alguno de los inmunomoduladores indicados actualmente un mínimo de 6 meses.
 - No haber tenido brotes en los últimos 3 meses.
 - Edad entre 18 y 60 años.

Para este estudio se incluyeron 4 pacientes con diagnóstico de NMO siguiendo los criterios de Wingerchuk y que presentaban anticuerpos anti-AQP4.

Asimismo, se seleccionaron 10 controles voluntarios sanos sin ninguna patología conocida que afectase al SNC.

- **Pacientes para el estudio de correlación entre LCR y lágrima (Tabla 2):** se incluyeron 6 pacientes con sospecha de EM que fueron citados para la extracción de LCR mediante punción lumbar. Dada la necesidad de ampliar el tamaño muestral, se incluyeron 16 pacientes con sospecha de demencia en colaboración con el Dr. Baquero, neurólogo del departamento de Alzheimer del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Se tomaron las muestras de lágrimas en el mismo momento de la extracción del LCR.
- **Pacientes para el estudio de estabilidad de la CHI3L1 (Tabla 3):** 14 pacientes del grupo 1 fueron citados de nuevo a los 3 meses y se extrajeron lágrimas para la cuantificación de la CHI3L1.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes sometidos a la cuantificación de CHI3L1 en lágrima

	EMPP	EMSP	EMRR	NMO	CTRL
N	9	16	23	4	10
Edad media (años)	56,22	54,68	45,83	56,5	42,4
Sexo (F / M)	8 / 1	8 / 8	18 / 5	4 / 0	9 / 1

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes en los que se estudió la correlación entre CHI3L1 en lágrima y LCR

	Estudio de demencias	EM
N	16	6
Edad media (años)	67,81	52,5
Sexo (F / M)	9 / 7	2 / 4

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes en los que se estudió la estabilidad temporal de la CHI3L1

	EMPP	EMSP	EMRR	NMO
N	3	6	4	1
Edad media (años)	53,66	47,5	38,25	61
Sexo (F / M)	2 / 1	3 / 3	4 / 0	1 / 0

3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LÁGRIMAS

3.2.1 Método de extracción con suero fisiológico

Se recogieron muestras de la película de lágrima precorneal (PCTF) mediante el uso de STS. Estas están compuestas por papel de filtro en el que las lágrimas se adhieren mediante capilaridad. Se colocó una STS en el párpado inferior de cada ojo y se pidió al paciente que permaneciera durante 5 minutos con los ojos cerrados.

Se anotó, en cada caso, los milímetros recorridos por la lágrima en la tira correspondiente a cada ojo, y si el paciente se había administrado algún tipo de gotas oftalmológicas previamente al momento de la recolección. Al finalizar los 5 minutos, se extrajeron las STS de los ojos del paciente y se introdujeron en tubos Eppendorf de baja adherencia de 0,5 ml (72.704.700, Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Alemania).

Se perforó con un punzón la base del Eppendorf de 0,5 ml y se colocó dentro de otro tubo Eppendorf de 1,5 ml, también de baja adherencia (0030 108 428, Eppendorf; Hamburgo, Alemania). Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se anotó el volumen eluído de lágrima. Se añadió suero fisiológico hasta 100 µl sobre el tubo con la STS y se volvió a centrifugar. Las muestras se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.2 Método de extracción de lágrima pura

En este caso, la lágrima se extrajo de manera idéntica, mediante el uso de tiras de Schirmer que se colocaron durante 5 minutos en los párpados inferiores de cada ojo.

La tira se introdujo en un Eppendorf de 0,5 ml y se perforó su base con un punzón para después colocarlo dentro de otro tubo de 1,5 ml y centrifugar 13000 rpm durante 1 minuto para eluir la lágrima.

Tras haber medido el volumen de lágrima recogido, se procedió a congelar las muestras a -80°C hasta su posterior uso.

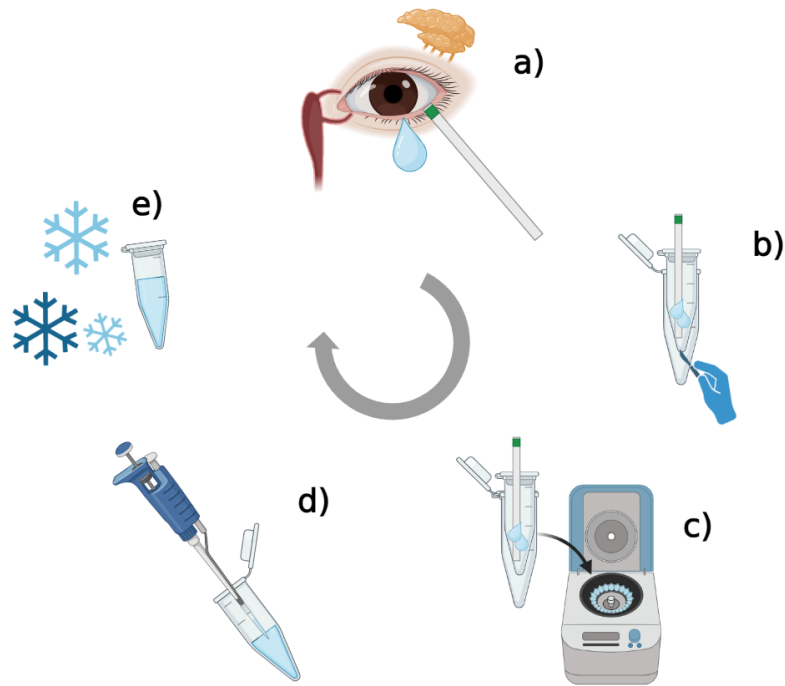


Figura 3. Proceso de obtención de las muestras de lágrima pura. Gráfico obtenido con www.biorender.com

3.3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CHI3L1 EN LÁGRIMAS

3.3.1 Western blot

Se llevó a cabo el Western blot con el fin de detectar la presencia de la CHI3L1 en lágrima. Debido al volumen reducido de muestra, no se realizó el paso previo de cuantificación de proteínas y se utilizaron 10 μ l de lágrima pura para el protocolo, pues el objetivo no era una comparación cuantitativa sino la detección.

Así pues, se mezclaron 10 μ l de lágrima con el Sample Buffer y con el reductor β -mercaptoetanol, y se calentó a 90°C 10 minutos con el fin de disgregar los puentes disulfuro que mantienen la estructura terciaria de la proteína. Se procedió montando el cassette de electroforesis y añadiendo en el compartimento del gel el tampón NuPAGE™ Tris Acetate SDS Running Buffer 20x (LA0041, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EE. UU) diluido a 1x con agua destilada y el antioxidante NuPAGE™ (NP0005, Thermo Fisher Scientific). Se cargaron las muestras y los patrones (SeeBlue; LC5625, Invitrogen; Waltham, Massachusetts, EE. UU) en los correspondientes pocillos y se inició la electroforesis en frío, previamente configurada a 130V y 500 mA durante 1 hora y media. Al terminar, se llevó a cabo la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. Para ello se montó el cassette de transferencia y se añadió tampón de transferencia NuPAGE™ Transfer Buffer 20x (NP00061, Thermo Fisher Scientific), que se diluyó a 1x con agua destilada, y se añadió antioxidante y metanol. Se programaron las condiciones de la electrotransferencia para 1 hora a 35V en frío. Una vez hecha la transferencia, se extrajo la membrana de nitrocelulosa del cassette y se incubó durante 1 hora y media con el bloqueo (leche en polvo al 5% en TBTSw 1%). A continuación, se incubó la membrana con un anticuerpo primario anti-CHI3L1 (PA5-43746, Invitrogen), diluido 1:300 en el tampón de bloqueo, durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavó la membrana 3 veces con TBSTw para eliminar el anticuerpo primario no unido y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (11420095, Thermo Fisher Scientific) diluido 1:1000 en el tampón de bloqueo, durante 1h. Se lavó 3 veces más la membrana con TBSTw. Por último, se aplicó el sustrato para el revelado durante 5 minutos en oscuridad, kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34580, Thermo Fisher Scientific), y se observó la señal generada con un lector de quimioluminiscencia (Amersham™ Imager 600).

3.3.2 ELISA

Para llevar a cabo la cuantificación de CHI3L1 en lágrima se probaron primero diversas diluciones con el fin de hallar el rango óptimo de detección y así evitar la sobresaturación de la señal o la baja detección de esta. Se probaron las diluciones 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 y 1/2000. Se cuantificaron los niveles de CHI3L1 en lágrima mediante la utilización de inmunoensayos enzimáticos (ELISA tipo sándwich). Se empleó el kit comercial *Human Chitinase 3-like 1 Quantikine ELISA Kit* (DC3L10; R&D Systems; Minneapolis, EE. UU), y se siguieron las instrucciones especificadas en el protocolo del mismo. De esta forma, se incubaron durante 2 horas en agitación suave las muestras de lágrima diluidas en un ratio 1:100 con diluyente de muestras y el anticuerpo monoclonal anti-CHI3L1 adherido en la base de la placa. Seguidamente, se realizaron los lavados pertinentes y se procedió a añadir el anticuerpo policlonal anti-CHI3L1, conjugado con el enzima durante 2 horas en agitación suave. Después, se volvió a lavar y se añadió el sustrato del enzima durante 30 minutos, tiempo tras el cual se detuvo la reacción con ácido sulfúrico y se determinó la cantidad de CHI3L1 mediante la medición de la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia 550 nm) empleando el lector de placas HaloLed 96 (WR-302-02x, Dynamica; Livingston, United Kingdom). Para el cálculo de la concentración de CHI3L1, se utilizó una curva estándar de ocho puntos partiendo de 4000 pg/ml y haciendo diluciones seriadas. Los datos fueron analizados utilizando el software de www.myassays.com que utiliza una curva PL de 4 parámetros.

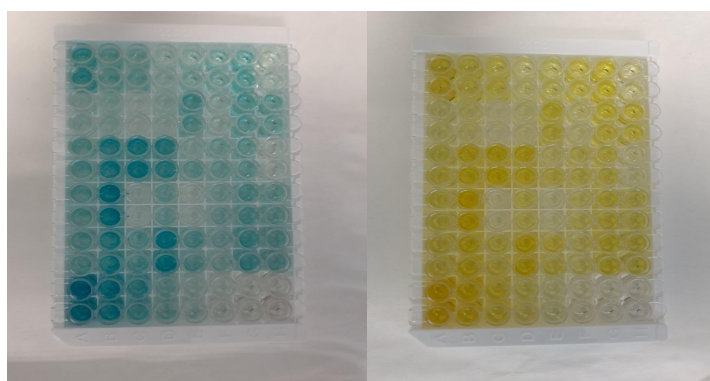


Figura 4. Placa ELISA tras añadir el sustrato (color azul) y después de aplicar la solución STOP (amarillo)

3.4 DETECCIÓN DE BOM

3.4.1 Puesta a punto del protocolo de isoelectroenfoque (IEF) en lágrimas

Se seleccionaron 6 pacientes ya diagnosticados de EM de mal pronóstico con Ig-M positivas en LCR. Se probaron diferentes diluciones de las lágrimas de estos pacientes con suero fisiológico (1/2, 1/5, 1/10, 1/25, 1/33, 1/50). Después se testaron 3 diluciones más, 1/100, 1/200 y 1/400, para encontrar un rango óptimo en el que poder comparar las BOM en lágrima con las de suero y LCR. La fecha de recogida de la lágrima no fue la misma que la del LCR, pues la punción lumbar se había realizado años antes.

3.4.2 Protocolo de electroforesis de IEF

Se preparó el gel de IEF calentando una mezcla de agua destilada, glicerol (24385.295, VWR; Radnor, Pensilvania, EE. UU), sorbitol (85529, Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, EE. UU) y agarosa (17046801, Cytiva; Marlborough, Massachusetts, EE. UU) en proporciones óptimas para el correcto avance de las Ig-M al aplicar la corriente. Tras alcanzar la homogeneidad y permaneciendo aún en calor, se aplicaron las anfolinas Pharmalytes 5-8 (GE17-0453-01, Sigma-Aldrich) y Pharmalytes 3-10 (P1522-25ML, Sigma-Aldrich). Se vertió la solución sobre una pieza de GelBond (GE80-1129-32, Sigma-Aldrich), colocado sobre el cristal del molde empleado para dar forma al gel. Se dejó solidificar 10 minutos y se introdujo en un recipiente hermético donde se mantuvo en refrigeración y humedad hasta el día siguiente. Para preparar las muestras, se llevaron a cabo las diluciones requeridas en las muestras de suero, LCR y lágrima y se procuró la reacción de reducción de las Ig-M, de estructura pentamérica, durante 30 minutos gracias a la aplicación de DTT y tampón Tris-HCl (proporción 8:1). Se depositó el gel sobre el equipo de IEF conectado a la fuente de alimentación y se aplicaron dos tiras de papel mojadas en soluciones de NaOH y H₂SO₄, respectivamente, para generar el gradiente de pH. Se colocó papel de filtro en los extremos superior e inferior del gel para eliminar toda la humedad posible, se aplicaron 5 µl de las muestras a cada pocillo y se dejaron correr durante 1 hora y 30 minutos a 1250 V, 150 mA, 10 W y 1800 V/h.

Transcurrido este tiempo, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF durante 18 minutos minimizando las burbujas al colocarla, poniendo papeles de filtro encima y un peso sobre ella. Después, se bloquearon las uniones inespecíficas con leche en polvo al 2% en suero fisiológico. Tras lavar con agua destilada, se añadieron 150 µl de anticuerpo anti-Ig-M biotinilado (B1265, R&D Systems) en un tampón de leche en polvo al 0,2% en suero fisiológico y se incubó la membrana en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente, se lavó la membrana con agua múltiples veces y se incubó con una solución de estreptavidina-fosfatasa alcalina (016-050-084, Jackson ImmunoResearch; West Grove, Pensilvania, EE. UU) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación (50 µl de estreptavidina en 0,12 g de leche en polvo y 60 ml de suero fisiológico). Se realizaron 25 lavados con agua destilada y se preparó la solución de sustrato BCIP/NBT (WP20001, Thermo Fisher Scientific) en agua destilada. La membrana se mantuvo en la solución hasta que se visualizaron correctamente las bandas oligoclonales. Por último, se lavó la membrana con abundante agua destilada y se secó en una estufa.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comprobó la normalidad de los grupos de los datos haciendo uso de la prueba de Shapiro-Wilk. Se comprobó la igualdad de las varianzas empleando la prueba de Levene. Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en un conjunto de grupos, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para observar las diferencias entre cada pareja de grupos con distribución no normal, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para analizar la presencia de relaciones entre variables, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman, por la no normalidad de los datos. Se utilizó, para determinar la estabilidad entre la medida de CHI3L1 en dos tiempos diferentes, la prueba de Wilcoxon. Para todas las pruebas estadísticas, se asumieron como significativos los valores inferiores a 0,05 con el fin de tratar de mantener el equilibrio entre la reducción de falsos positivos y el aumento de falsos negativos (Miller & Ulrich, 2019).

4 RESULTADOS

- Detección de CHI3L1 en lágrimas

Mediante el Western blot, como puede observarse en la Figura 5, se determinó la presencia de CHI3L1 en las lágrimas de 2 pacientes con EM (formas clínicas EMPP y EMRR) y 1 paciente sin enfermedades neurológicas. A pesar de cargar 10 μ l de todas las muestras sin cuantificar previamente la concentración de proteína total, se observan bandas de mayor grosor en los pacientes con EM que en el control.

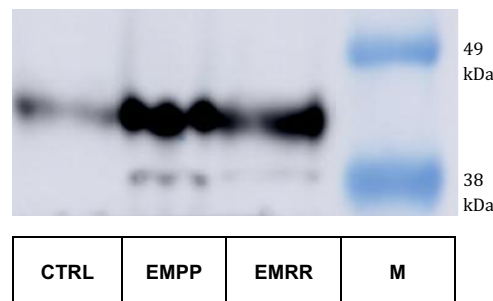


Figura 5. Resultado de Western blot de CHI3L1 en lágrimas de paciente control (P1 – CTRL), paciente con EM primaria progresiva (P2 – EMPP), paciente con EM remitente-recurrente (P3 – EMRR) y marcador de pesos moleculares (M)

- Niveles de CHI3L1 en las distintas formas de EM

El rango de dilución óptimo para la cuantificación de CHI3L1 en lágrima mediante ELISA resultó ser 1/100. El grupo con EM presentó una concentración de CHI3L1 de 58 ng/ml (37-98), mientras que la del grupo con NMO fue 29,78 ng/ml (24-34 ng/ml).

Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p\text{-value} = 0,037$). La mediana del grupo control fue 30,22 ng/ml (16-42 ng/ml), y también se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo con EM ($p\text{-value} = 0,02$) (Figura 6).

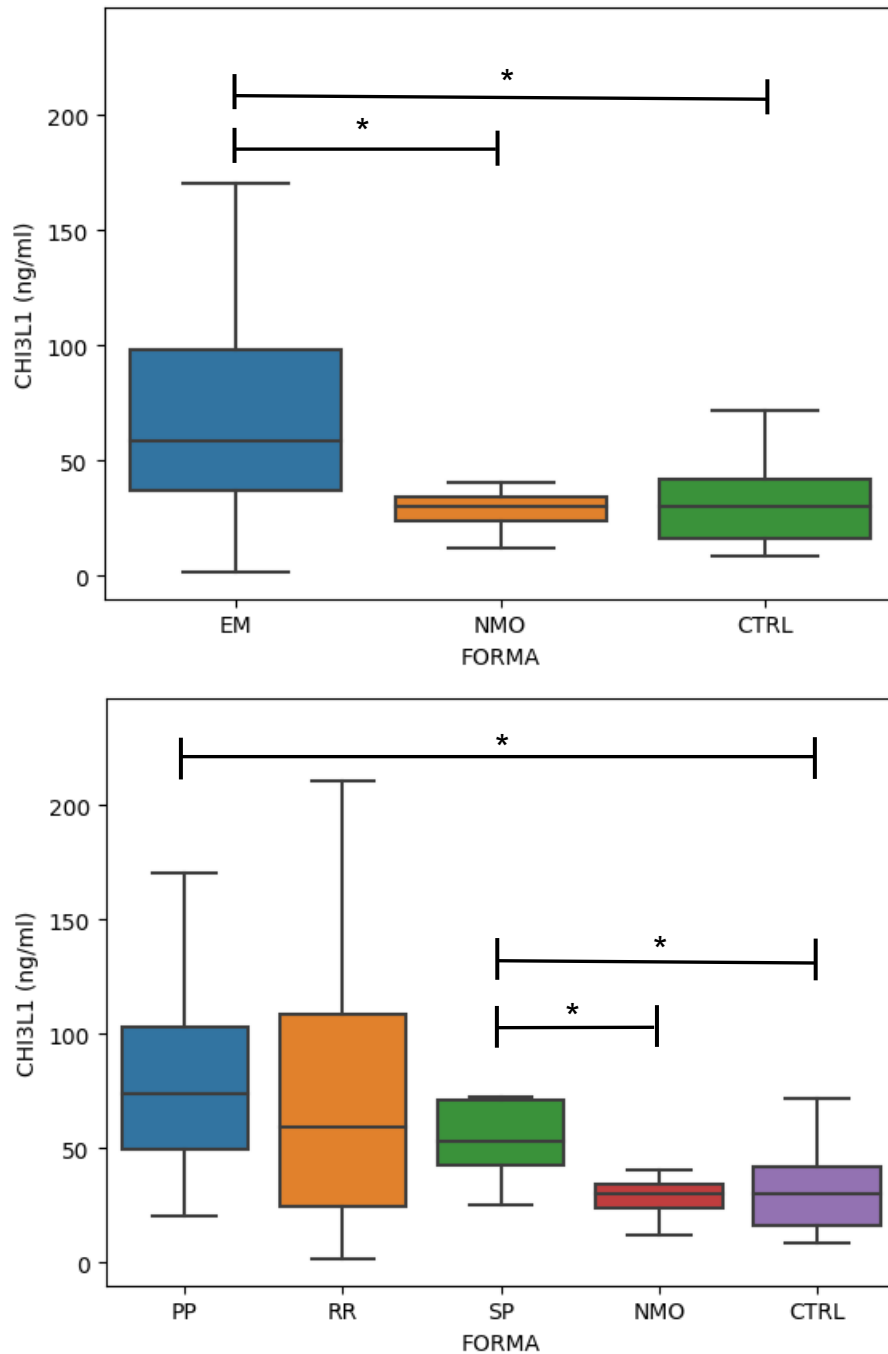


Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes representando la concentración de CHI3L1 en los distintos grupos (EM – Esclerosis Múltiple; PP – EM Primaria Progresiva; RR – EM Remitente-Recurrente; SP – EM Secundaria Progresiva; NMO – Neuromielitis Óptica; CTRL – Grupo Control)

Se demostró que existían diferencias significativas entre los perfiles de CHI3L1 de los 5 grupos de la cohorte ($p\text{-value} = 0,049$). Sin embargo, al analizar los grupos entre sí, solo 3 parejas presentaron distinciones en concentración de CHI3L1.

Los niveles de CHI3L1 en el grupo EMSP, con 52,61 ng/ml (43-71 ng/ml), fueron estadísticamente superiores a los del grupo control, con 30,22 ng/ml (16-42 ng/ml) (p -value = 0,025) y también a los del grupo con NMO, con 29,78 ng/ml (24-34 ng/ml), (p -value = 0,016). Por otro lado, el grupo EMPP, con 74 ng/ml (50-103 ng/ml), también presentó niveles estadísticamente más elevados que el grupo control, 30,22 ng/ml (16-42 ng/ml), (p -value = 0,03). Se buscó, adicionalmente, la posible diferencia en niveles de CHI3L1 entre las formas progresivas (EMPP y EMSP) y EMRR, pero el estadístico confirmó que no había suficiente evidencia como para considerarlas poblaciones diferentes (p -value = 0,725).

- Correlación entre los niveles de CHI3L1 y otros parámetros

No fue posible demostrar la existencia de correlación positiva entre la concentración de CHI3L1 y la edad de los pacientes ($Spearman = 0,12$; p -value = 0,33). Tampoco fue posible encontrar correlación entre los niveles de CHI3L1 y la EDSS ($Spearman = 0,14$; p -value = 0,31) en esta cohorte. Estos hallazgos contrastan con los producidos por estudios previos en los que sí que se encontró correlación entre los niveles de CHI3L1 y la puntuación total de EDSS (Talaat et al., 2023). La concentración de CHI3L1 y de NfL en suero tampoco presentaban ninguna relación lineal significativa ($Spearman = 0,05$ p -value = 0,72).

- Correlación entre los niveles de CHI3L1 en lágrima y LCR

No se observó correlación significativa entre los niveles de CHI3L1 en LCR y los niveles en lágrimas teniendo en cuenta la totalidad de los pacientes a los que se les realizó la cuantificación de CHI3L1 en ambos fluidos (pacientes con posible demencia y pacientes con EM, N = 22). ($Spearman = -0,05$; p -value = 0,84).

Al repetir este análisis de tendencia manteniendo únicamente a los pacientes con sospecha de EM (N = 6), el valor del coeficiente de Spearman fue de 0,77 (p -value = 0,072). No ocurrió lo mismo al analizar los pacientes con sospecha de demencia por separado (N = 16) ($Spearman = -0,37$; p -value = 0,16).

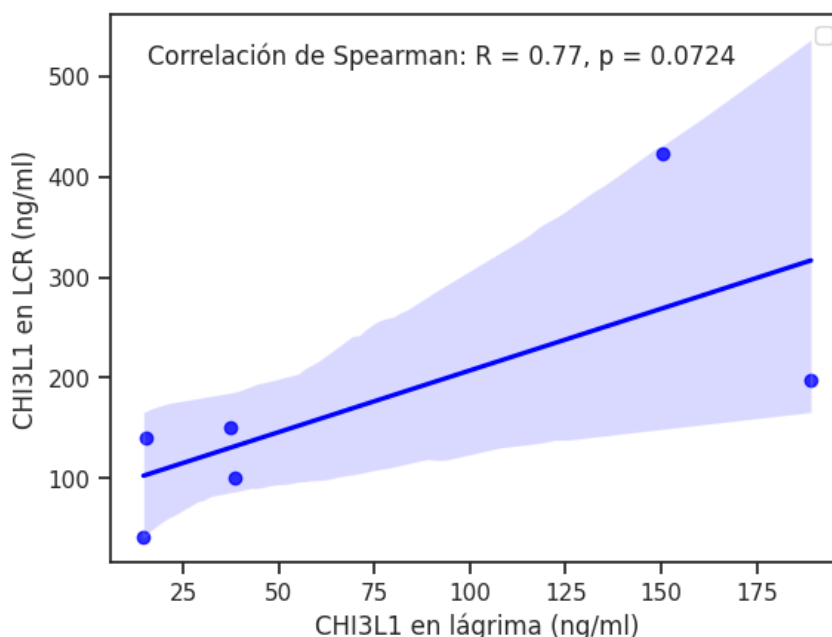


Figura 7. Correlación de los niveles de CHI3L1 entre lágrima y LCR en pacientes con EM.

- **Estabilidad temporal de los niveles de CHI3L1**

Las diferencias entre las concentraciones de CHI3L1 en lágrima entre ambos tiempos siguieron una distribución no normal (*Shapiro-Wilk, p-value = 0,007*). Se concluyó que la CHI3L1 no presentaba variaciones significativas en su concentración en un intervalo temporal de 2 a 4 meses (*Wilcoxon emparejado, p-value = 0,08*) (Figura 8).

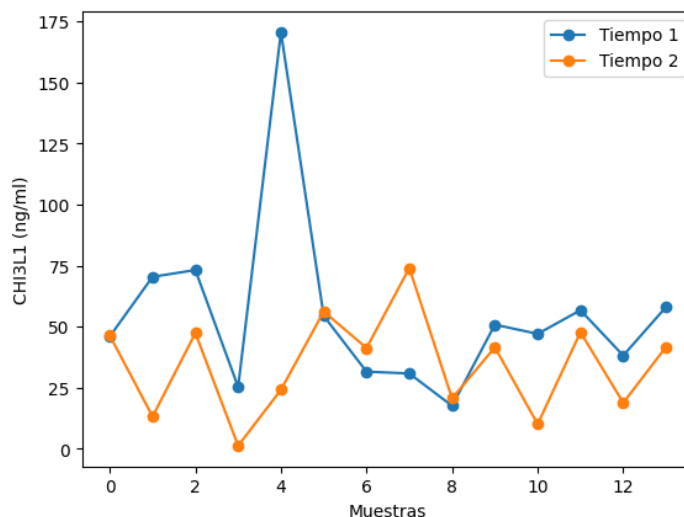


Figura 8. Variación temporal en la concentración de CHI3L1

- **BOM en lágrima**

Se detectaron BOM en todas las lágrimas de los pacientes Ig-M+ en LCR analizados (Figura 9).

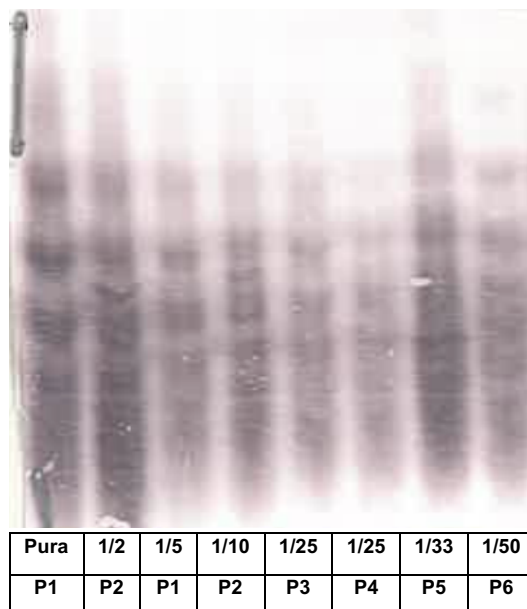


Figura 9. Prueba de diluciones para la detección de BOM en lágrima. En la imagen se muestra la intensidad de señal con distintos rangos de dilución. Las muestras 1 y 3 y 2 y 4 corresponden a los mismos pacientes, pero distinta dilución, el resto son pacientes diferentes.

Se determinó que incluso en la muestra diluida 50 veces, la concentración de Ig-M era demasiado alta, y la señal se obtenía a los pocos minutos de revelado, por lo que resultaría difícil equiparar la intensidad de las bandas con las de suero y LCR que se revelan durante más tiempo. Por este motivo, se probaron dos rangos de dilución adicionales, 1/200 y 1/400. Sin embargo, estas muestras resultaron estar demasiado diluidas, por lo que finalmente se optó por emplear la dilución 1/100, que resultó ser la óptima para la comparación con muestras de suero y LCR. Se seleccionaron dos pacientes Ig-M+ en LCR, y a dos pacientes Ig-M-, también en LCR. Se analizó la presencia de BOM en las muestras de suero, LCR y lágrima de cada uno de los pacientes, como se muestra en la Figura 10. Los pacientes con Ig-M+ en LCR presentan bandas oligoclonales representadas como medias lunas de mayor intensidad en la muestra de LCR y también aparecen en la lágrima, pero no en el suero, apuntando a una síntesis intratecal y lacrimal de estas. En el primer paciente son similares a las del LCR, pero en LCR son más abundantes. En el segundo paciente la positividad en la lágrima es mayor que en el LCR. En los pacientes con BOM- vemos como una sombra de bandeado es apreciable tanto en suero como en LCR y lágrima, pero no existe ninguna banda marcada con la característica forma de medialuna y de mayor intensidad ni en LCR ni en lágrima que nos indique la síntesis de Ig-M en estos fluidos frente a su ausencia en el suero, de ahí que se consideren negativas.

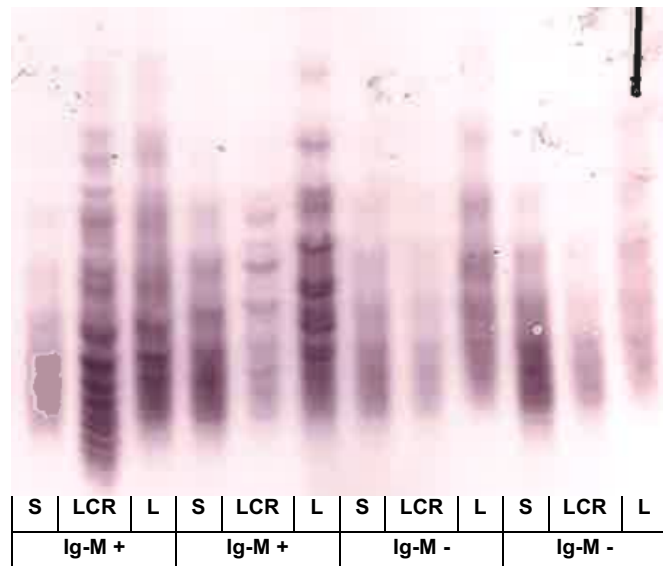


Figura 10. BOM en suero, LCR y lágrima de dos pacientes Ig-M+ (P5 y P6 de la figura 7) y de dos pacientes Ig-M-.

- **En un porcentaje determinado de recolecciones no se logró obtener suficiente lágrima para que la cuantificación fuera posible**

En el 25% de las ocasiones en las que se intentó extraer lágrima para llevar a cabo los análisis, no se alcanzó el umbral mínimo de volumen necesario para realizar la cuantificación por inmunoensayo. Este es uno de los problemas principales de este método. Incluso siendo el mismo paciente, en ciertas ocasiones se logró extraer suficiente, y en otras el volumen conjunto de ambos ojos no llegaba a los 2 µl y no se podía guardar la muestra (síndrome de ojo seco, comorbilidades, entre otros). De 56 pacientes con diferentes formas clínicas de EM y NMO (*Tabla 1*), 31 de ellos (55,35%) no alcanzaron a mojar 10 mm de la tira STS en al menos uno de los dos ojos.

De los mismos 56 pacientes, 16 de ellos (28,57%) no alcanzaron a mojar los 10 mm de la tira STS en ninguno de los dos ojos (criterio de producción anormal de lágrimas e indicativo de presencia de síndrome de ojo seco). Si se considerasen 5 mm en 5 minutos (producción de lagrime anormalmente severa), el 35,71% de los pacientes no lograron superar los 5 mm en al menos un ojo, mientras que el 8,93% no lo alcanzaron en ninguno de los ojos.

5 DISCUSIÓN

La utilización de lágrima como material biológico de partida para el análisis de biomarcadores en la EM presenta ventajas considerables que podrían ser determinantes no solo para los pacientes, sino para todo el sistema de salud.

Por un lado, los pacientes que tienen que enfrentar la punción lumbar como medio para conocer el pronóstico de su enfermedad sufren dolor y posteriores efectos en su salud a corto plazo. La punción lumbar es una técnica invasiva, en la que se utiliza anestesia, y en la que pueden surgir numerosos efectos adversos como cefalea de grado leve a intensa, mareos, náuseas, vómitos, visión borrosa, sensibilidad a la luz y tinnitus (Costerus et al., 2018), por lo que se aconseja un tiempo de recuperación mínimo y estar tumbado por si aparece alguno de estos síntomas.

La recolección de lágrima es un método indoloro y seguro cuya mayor complicación radica en la irritación ocular post-recolección en algunos pacientes, que puede tener una duración máxima de una hora. Además de lo inocua que resulta esta técnica, también es muy rápida, ya que los pacientes solo deben aguantar cinco minutos con las tiras introducidas en el párpado inferior.

Además de los innumerables beneficios que tiene la estandarización del análisis en lágrima para los pacientes, este material biológico también presenta un atractivo considerable para los sistemas nacionales de salud. Para la realización de una punción lumbar, el paciente debe disponer de un pijama limpio en una cama del hospital que debe prepararse previamente. Debe suministrársele a la par agentes anestésicos y analgésicos para evitar en gran medida la sensación de dolor que acompaña a esta técnica. Y, por último, para llevar a cabo la punción en sí, se necesitan agujas estériles, gasas, y material quirúrgico que debe ser autoclavado antes de su uso y preparado por enfermeras del sector. La recolección de lágrima, por otro lado, presenta una sencillez incomparable. El paciente no debe ser hospitalizado ni sedado ya que el método es completamente indoloro, no acarrea efectos secundarios, y no se debe utilizar material esterilizado ni quirúrgico, ya que solo se emplean tiras de Schirmer y tubos Eppendorf. El coste asociado a la recolección de lágrimas en comparación con la punción lumbar es extremadamente inferior, por lo que esta técnica podría ser asumible como estándar en casi todos los sistemas de salud del mundo. Por todo ello, se debe investigar más acerca de la fiabilidad y validez de este fluido biológico para determinados fines médicos, como el análisis de biomarcadores diagnósticos y/o pronósticos en enfermedades neurológicas como la EM.

Tras evaluar los posibles métodos de recolección de lágrima que mejor ayudaban a alcanzar los objetivos propuestos, se consideró más fiable la extracción de lágrima pura para la cuantificación de CHI3L1 mediante ELISA, ya que mediante la adición de suero fisiológico sobre la STS se diluye la lágrima recogida y no se podía conocer a ciencia cierta el factor de dilución aplicado (si quedaba algún μ l sin eluir en la tira).

En cambio, para el análisis de BOM en lágrima, la dilución de las muestras con suero fisiológico no introducía ningún error, debido a la naturaleza cualitativa que posee la inmuno-detección de Ig-M. Además, esta dilución es necesaria con el fin de evitar sobresaturar la señal. Como ya se ha comentado previamente, diluyendo la lágrima en una proporción 1/100, se ha logrado detectar las Ig-M sin excesivo ruido de fondo.

En el presente estudio, se ha fijado la atención en la concentración diferencial de CHI3L1 en lágrima de pacientes con EM. Se ha determinado la existencia de niveles estadísticamente superiores de esta proteína en estos pacientes respecto a controles e incluso a casos de NMO y, dentro de los casos de EM, existe una tendencia a ser mayor en las formas de EMPP. Atendiendo a lo que ocurre en el LCR, la CHI3L1 tiende a aparecer en mayor concentración en pacientes con formas clínicas en las que predomina la progresión (Canto et al., 2012; Mane-Martinez et al., 2016; Sellebjerg et al., 2017). Puesto que los niveles de CHI3L1 en suero sanguíneo pueden reflejar la existencia de inflamación periférica vinculada a otras afecciones, como el lupus o la artritis reumatoide (Floro et al., 2022), la CHI3L1 en suero no acaba de resultar del todo útil en la EM, puesto que no logra reflejar objetivamente la situación patológica en el SNC. Por ello, hemos decidido estudiar los patrones de concentración de esta proteína en la lágrima de los pacientes con EM. La lágrima como fluido alternativo para el análisis de biomarcadores de enfermedades neurológicas presenta un gran potencial, ya que se considera un fluido intermedio entre el LCR y la sangre (Pieragostino et al., 2019). El análisis de biomarcadores en lágrima presenta ventajas inigualables, como su menor complejidad biológica en comparación con otros fluidos humanos, o la baja invasividad que caracterizan a las técnicas que se emplean para su recolección (Hagan et al., 2019).

Como es posible observar en la Figura 6, los niveles de CHI3L1 se encuentran en mayor proporción en todas las formas de EM cuando se comparan con el grupo control y con el grupo con NMO. Estos hallazgos no resultan sorprendentes, puesto que la NMO es una enfermedad en la que los pacientes que se encuentran en fase de remisión presentan una clínica similar a los controles y otros autores han determinado lo mismo en cuanto a CHI3L1 en LCR (Cubas-Núñez, 2020). Dentro de las formas de EM, se han observado mayores niveles de CHI3L1 en las formas clínicas progresivas EMPP. Los niveles son significativos respecto al grupo control. Sin embargo, no son significativos frente a otras formas clínicas de la enfermedad, como la EMRR. Esto es debido principalmente a que el grupo de pacientes con EMRR presenta una gran dispersión en la concentración de CHI3L1 (24-108 ng/ml). Esta heterogeneidad viene a consecuencia de que un porcentaje de pacientes con EMRR suelen ser diagnosticados más tarde como EMSP, en función de cómo evolucionen. Estos resultados son similares a los hallados en estudios previos de CHI3L1 en LCR, donde del mismo modo, las formas progresivas presentaban mayores niveles y la dispersión en el grupo EMRR podía explicarse porque cabía la posibilidad de que los pacientes con mayor concentración de CHI3L1 pudieran evolucionar después a una forma EMSP (Gil-Perotín et al., 2019). Aun así, al estudiar la correlación entre CHI3L1 procedente de lágrima y de LCR, no hemos observado significación. Esta ausencia de correlación puede ser debida a que hemos incluido pacientes con sospecha de demencias (N=16). Si analizamos esta correlación empleando únicamente los datos de estos 16 pacientes, el coeficiente de Spearman es negativo. Sin embargo, al analizar por separado los que presentan sospecha de EM (N=6), la correlación mejora notablemente. Este hallazgo podría deberse a que en el grupo de pacientes con sospecha de demencia existen otras variables que no se han contemplado en el presente estudio. Si quisiéramos explorar definitivamente la correlación entre los niveles de esta proteína en lágrima y LCR, sería de gran interés aumentar la N únicamente con pacientes de sospecha o diagnóstico de EM de los que se obtuviera simultáneamente muestra de lágrima y LCR para seguir estudiando este patrón.

En cuanto a la estabilidad del biomarcador, se incluyeron en el análisis 14 pacientes de los que se obtuvieron dos muestras de lágrima con 2-4 meses de diferencia. Se ha observado que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los dos tiempos, por lo que es plausible asumir la estabilidad de este biomarcador. Cabe destacar que en dos pacientes se observaron niveles de CHI3L1 notablemente más altos en una de las dos mediciones y que no han podido ser explicados estudiando la clínica de ambos pacientes.

Por otro lado, hemos querido analizar la presencia de BOM en las muestras de lágrima ya utilizadas para otros fines en este estudio. Hasta la fecha, solo se habían detectado Ig-G en lágrimas de pacientes con EM, y se determinó que solo el 67% de los pacientes con EM presentaban BOC-Ig-G en lágrima (Coyle et al., 1987). En otro estudio se concluyó que no era posible obtener suficiente volumen de todos los pacientes, con el 22% de los mismos presentando material insuficiente (Hümmert et al., 2019). Debido principalmente a este inconveniente, la lágrima se ha visto relegada a un segundo plano por no ser un fluido totalmente resolutivo para el 100% de los pacientes. En este estudio, se buscó descubrir la existencia de BOM en lágrima. Hicimos una prueba empleando diferentes diluciones y en todas obtuvimos resultados positivos, considerando la dilución 1/100 como la más resolutiva. Posteriormente, se analizaron simultáneamente suero, LCR y lágrima y se observó que la lágrima, al igual que ocurre con el LCR, presentaba bandas con forma de medialuna y de mayor intensidad que nos permitía clasificar a los pacientes en positivos y negativos, basándose en la presencia diferencial de estas bandas en la lágrima y ausencia de estas en el suero. Ahora bien, el patrón de bandas observado en la lágrima y en el LCR no parece ser exactamente el mismo, sino que comparten únicamente ciertas bandas. Además, en los pacientes negativos se observa la presencia de sombreado de bandas, pero este fenómeno también ocurre en muestras de suero y LCR negativos, puesto que se trata de otras proteínas que debido a su elevada concentración se tiñen como ruido de fondo.

Por otra parte, cabe destacar que en las muestras analizadas suero-LCR-lágrima (Figura 10) el paciente 1 presenta una diferencia temporal de 7 años entre la extracción del LCR y de la lágrima, y el paciente 2, de 1 año, por lo que el patrón de síntesis de bandas oligoclonales quizás no sea constante y pueda variar con el tiempo. En los 2 pacientes BOM- sí que se extrajeron el LCR y la lágrima al mismo tiempo.

Hasta la fecha, este es el primer trabajo en el que se determina la existencia de BOM en lágrimas de pacientes con EM. Este biomarcador presenta una gran importancia puesto que permitiría discernir entre aquellos pacientes que presentan una forma clínica de EM más agresiva y un peor pronóstico global de los que no. Estos hallazgos abren un nuevo camino a un estudio prospectivo en el que se comparen muestras de suero, LCR y lágrima de distintos pacientes, y obtenidas en la misma fecha, para validar este biomarcador y poder quizás implantar esta técnica como una prueba útil en el conocimiento de la clínica del paciente.

En nuestra investigación, el 25% de las extracciones realizadas no fueron exitosas. Esto se debió principalmente a la imposibilidad de obtener el volumen mínimo necesario (2 µl) para que la detección mediante inmunoensayo pudiese ser posible. Ya se conocía esta problemática gracias a estudios anteriores. Por ejemplo, en un estudio basado en la búsqueda en lágrima de BOC-Ig-G, llevado a cabo por Hümmert et al. en 2019, el 22% de pacientes tuvieron que ser excluidos del análisis por no poseer el volumen mínimo necesario. De algunos de los pacientes citados para la recolección, no fue posible obtener los 2 µl en ninguna de las ocasiones. Esto podría explicarse por la presencia de comorbilidades oftalmológicas, como el síndrome del ojo seco.

En la última década, se ha planteado la posible conexión entre las enfermedades neurodegenerativas y una menor sensibilidad corneal. En algunos estudios, como aquel llevado a cabo por Örnek et al. en 2015, se obtuvieron resultados que probaban que pacientes con enfermedades con degeneración a nivel de SNC como la EM, el Parkinson, el Alzheimer o la ataxia de Friederich, presentaban una menor estabilidad en la película precorneal, y, además, obtenían peores resultados en la prueba de Schirmer. No se pudieron obtener datos suficientemente concluyentes sobre posibles patologías oculares de los pacientes que no cumplieron los criterios de volumen mínimo, por lo que no se pudo establecer una relación estadística entre la afectación oftalmológica y la neurodegeneración en esta muestra. Aunque sí que se obtuvo un porcentaje de los pacientes que podrían, potencialmente, cumplir los criterios para el diagnóstico del síndrome del ojo seco, ya que, aunque el marco diagnóstico varía entre países, normalmente se considera indicativo de patología un valor en la prueba de Schirmer de entre 5 y 10 mm, y muy indicativo si este valor es menor a 5 mm (Tsubota et al., 2020).

A la luz de los datos obtenidos en este estudio, la relación parece ser lo suficientemente fuerte como para continuar la investigación de la posible relación entre este síndrome y la neurodegeneración. Por otro lado, había otros pacientes de los que se pudo obtener suficiente lágrima en ciertas ocasiones, pero no en otras. Esta variabilidad de volumen intrapersonal podría explicarse por el hecho de que la hora en la que se realiza la recolección de muestra influye en el volumen de lágrima recogido. Se ha demostrado que existe variación en el volumen de lágrima basal en función de la hora del día, siendo este volumen mayor al despertar, y decreciente a lo largo del día (Ayaki et al., 2019).

Otro de los inconvenientes se presenta a la hora de trabajar de forma manual con volúmenes en el orden de la unidad de microlitro. Mediante el empleo de equipos con mayor sensibilidad y precisión, como Simoa® (Quanterix Corp.; Billerica, Massachusetts, EE. UU), sería posible reducir el número de muestras excluidas, requiriéndose volúmenes mínimos para los análisis.

Asimismo, existe un número de pacientes que admiten con reticencia la recogida de lágrima mediante el uso de STS, ya que, aunque este represente uno de los métodos de recolección de lágrima basal más seguros e indoloros, existen pacientes con sensibilidad ocular que experimentaron molestias. Cabe añadir además que la recogida de lágrimas no es una práctica estandarizada en clínica, ya que está reservada normalmente a ambientes relacionados con la oftalmología. Es por ello por lo que dentro del personal sanitario existen profesionales que no están familiarizados con esta técnica y pueden surgir complicaciones como la abrasión o la irritación a la hora de introducir las STS, por la simple falta de práctica.

No obstante, la gran mayoría de pacientes sugirieron que preferían mucho antes la recolección de lágrima que la punción lumbar, ya que, aunque las tiras puedan causar cierta irritación, incomodidad, y sensación de cuerpo extraño durante cinco minutos, no es comparable a la molestia y a la recuperación a la que se tienen que enfrentar los pacientes al someterse a la extracción de LCR.

6 CONCLUSIONES

A pesar de los inconvenientes que presenta la lágrima como material de partida para analizar biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, es evidente que las ventajas para los pacientes y los sistemas de salud presentan un peso muy considerable que puede contrarrestar a las limitaciones.

Se han observado concentraciones superiores de CHI3L1 en la lágrima de los pacientes con EM, con una tendencia a ser mayor en las formas puramente progresivas.

También ha sido posible detectar, por primera vez en lágrima, BOM en pacientes que ya presentaban estas bandas en el LCR, aportando el mismo valor clínico con menores efectos adversos. Estos hallazgos abren las puertas a nuevos estudios prospectivos que profundicen en el valor que poseen las lágrimas como material biológico de partida y logren estandarizar esta nueva realidad con el fin de minimizar las técnicas invasivas de toma de muestras a los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

7 REFERENCIAS

- ABDO, W. F., VAN DE WARRENBURG, B. P. C., MUNNEKE, M., VAN GEEL, W. J. A., BLOEM, B. R., KREMER, H. P. H., & VERBEEK, M. M. (2006). CSF analysis differentiates multiple-system atrophy from idiopathic late-onset cerebellar ataxia. *Neurology*, 67(3), 474–479. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000227891.25592.8c>
- ACERA, A., ROCHA, G., VECINO, E., LEMA, I., & DURÁN, J. A. (2008). Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Research*, 40(6), 315–321. <https://doi.org/10.1159/000150445>
- ALCOLEA, D., VILAPLANA, E., PEGUEROLES, J., MONTAL, V., SÁNCHEZ-JUAN, P., GONZÁLEZ-SUÁREZ, A., POZUETA, A., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E., BARTRÉS-FAZ, D., VIDAL-PIÑEIRO, D., GONZÁLEZ-ORTIZ, S., MEDRANO, S., CARMONA-IRAGUI, M., SÁNCHEZ-SAUDINÓS, M., SALA, I., ANTON-AGUIRRE, S., SAMPEDRO, F., MORENAS-RODRÍGUEZ, E., CLARIMÓN, J., ... FORTEA, J. (2015). Relationship between cortical thickness and cerebrospinal fluid YKL-40 in predementia stages of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(6), 2018–2023. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.001>
- ÁLVAREZ-CERMEÑO, J. C., & VILLAR, L. M. (2013). Multiple sclerosis: Oligoclonal bands--a useful tool to avoid MS misdiagnosis: Multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 9(6), 303–304. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.74>
- AYAKI, M., TACHI, N., HASHIMOTO, Y., KAWASHIMA, M., TSUBOTA, K., & NEGISHI, K. (2019). Diurnal variation of human tear meniscus volume measured with tear strip meniscometry self-examination. *PloS One*, 14(4), e0215922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215922>
- BALASHOV, K. E., ROTTMAN, J. B., WEINER, H. L., & HANCOCK, W. W. (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6873–6878. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6873>
- BALZANO, T., ARENAS, Y. M., DADSETAN, S., FORTEZA, J., GIL-PEROTIN, S., CUBAS-NUÑEZ, L., CASANOVA, B., GRACIÀ, F., VARELA-ANDRÉS, N., MONTOLIU, C., LLANSOLA, M., & FELIPO, V. (2020). Sustained hyperammonemia induces TNF-a IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-

NF- κ B pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 70.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01746-z>

BARMADA, A., & SHIPPY, S. A. (2020). Tear analysis as the next routine body fluid test. *Eye*, 34(10), 1731–1733. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-0930-0>

BARRO, C., BENKERT, P., DISANTO, G., TSAGKAS, C., AMANN, M., NAEGELIN, Y., LEPPERT, D., GOBBI, C., GRANZIERA, C., YALDIZLI, Ö., MICHALAK, Z., WUERFEL, J., KAPPOS, L., PARMAR, K., & KUHLE, J. (2018). Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 141(8), 2382–2391. <https://doi.org/10.1093/brain/awy154>

BARTOSIK-PSUJEK, H., & STELMASIAK, Z. (2005). The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 12(1), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2004.00951.x>

BERGHMANS, N., HEREMANS, H., LI, S., MARTENS, E., MATTHYS, P., SOROKIN, L., VAN DAMME, J., & OPDENAKKER, G. (2012). Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 243. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-243>

BJORNEVIK, K., CORTESE, M., HEALY, B. C., KUHLE, J., MINA, M. J., LENG, Y., ELLEDGE, S. J., NIEBUHR, D. W., SCHER, A. I., MUNGER, K. L., & ASCHERIO, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>

BLENNOW, K., HAMPEL, H., WEINER, M., & ZETTERBERG, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, 6(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>

BONNEH-BARKAY, D., BISSEL, S. J., KOFLER, J., STARKEY, A., WANG, G., & WILEY, C. A. (2012). Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation: YKL-40 expression in macrophages and astrocytes. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 22(4), 530–546. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00550.x>

BONNEH-BARKAY, D., BISSEL, S. J., WANG, G., FISH, K. N., NICHOLL, G. C. B., DARKO, S. W., MEDINA-FLORES, R., MURPHEY-CORB, M., RAJAKUMAR, P. A., NYAUNDI, J., MELLORS, J. W., BOWSER, R., & WILEY, C. A. (2008). YKL-40, a marker of simian immunodeficiency virus encephalitis, modulates the biological activity of basic fibroblast growth factor. *The American Journal of Pathology*, 173(1), 130–143. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080045>

BONNEH-BARKAY, D., WANG, G., LAFRAMBOISE, W. A., WILEY, C. A., & BISSEL, S. J. (2012). Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the absence of breast regression protein 39/chitinase 3-like 1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71(11), 948–958. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31826eae7>

- BÖRGER, M., FUNKE, S., BÄHR, M., GRUS, F., & LINGOR, P. (2015). Biomarker sources for Parkinson's disease: Time to shed tears? *Basal Ganglia*, 5(2–3), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2015.05.001>
- BOSCA, I., VILLAR, L. M., CORET, F., MAGRANER, M. J., SIMÓ-CASTELLÓ, M., ALVAREZ-CERMEÑO, J. C., & CASANOVA, B. (2010). Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 16(7), 810–815. <https://doi.org/10.1177/1352458510371961>
- CAI, L., & HUANG, J. (2018). Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 2241–2254. <https://doi.org/10.2147/NDT.S173280>
- CANTÓ, E., REVERTER, F., MORCILLO-SUÁREZ, C., MATESANZ, F., FERNÁNDEZ, O., IZQUIERDO, G., VANDENBROECK, K., RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD, A., URCELAY, E., ARROYO, R., OTAEGUI, D., OLASCOAGA, J., SAIZ, A., NAVARRO, A., SANCHEZ, A., DOMÍNGUEZ, C., CAMINERO, A., HORGA, A., TINTORÉ, M., ... COMABELLA, M. (2012). Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 18(7), 983–990. <https://doi.org/10.1177/1352458511433063>
- CANTÓ, ESTER, TINTORÉ, M., VILLAR, L. M., COSTA, C., NURTDINOV, R., ÁLVAREZ-CERMEÑO, J. C., ARRAMBIDE, G., REVERTER, F., DEISENHAMMER, F., HEGEN, H., KHADEMI, M., OLSSON, T., TUMANI, H., RODRÍGUEZ-MARTÍN, E., PIEHL, F., BARTOS, A., ZIMOVA, D., KOTOUCOVA, J., KUHLE, J., ... COMABELLA, M. (2015). Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 4), 918–931. <https://doi.org/10.1093/brain/awv017>
- CHANG, A. Y., & PURT, B. (2023). *Biochemistry, Tear Film*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34283502/>
- CHOJNOWSKA, S., BARAN, T., WILIŃSKA, I., SIENICKA, P., CABAJ-WIATER, I., & KNAŚ, M. (2018). Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.002>
- CHUPP, G. L., LEE, C. G., JARJOUR, N., SHIM, Y. M., HOLM, C. T., HE, S., DZIURA, J. D., REED, J., COYLE, A. J., KIENER, P., CULLEN, M., GRANDSAIGNE, M., DOMBRET, M.-C., AUBIER, M., PRETOLANI, M., & ELIAS, J. A. (2007). A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *The New England Journal of Medicine*, 357(20), 2016–2027. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073600>
- CICALINI, I., ROSSI, C., PIERAGOSTINO, D., AGNIFILI, L., MASTROPASQUA, L., DI IOIA, M., DE LUCA, G., ONOFRJ, M., FEDERICI, L., & DEL BOCCIO, P. (2019). Integrated lipidomics and metabolomics analysis of tears in multiple sclerosis: An insight into diagnostic potential of lacrimal fluid. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1265. <https://doi.org/10.3390/ijms20061265>
- COMABELLA, M., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, R., RIVERA-VALLVÉ, S., BORRÁS, E., CHIVA, C., JULIÀ, E., ROVIRA, A., CANTÓ, E., ALVAREZ-CERMEÑO, J. C., VILLAR, L. M., TINTORÉ, M., & MONTALBAN, X. (2010). Cerebrospinal fluid

chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 133(Pt 4), 1082–1093. <https://doi.org/10.1093/brain/awq035>

COSTERUS, J. M., BROUWER, M. C., & VAN DE BEEK, D. (2018). Technological advances and changing indications for lumbar puncture in neurological disorders. *Lancet Neurology*, 17(3), 268–278. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30033-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30033-4)

COYLE, P. K., SIBONY, P., & JOHNSON, C. (1987). Oligoclonal IgG in tears. *Neurology*, 37(5), 853–853. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.5.853>

CUBAS-NÚÑEZ, L. (2020). Inmunidad innata en esclerosis múltiple progresiva: papel de la chitinase 3-like 1. Universitat de València.

CUBAS-NÚÑEZ, L., GIL-PEROTÍN, S., CASTILLO-VILLALBA, J., LÓPEZ, V., SOLÍS TARAZONA, L., GASQUÉ-RUBIO, R., CARRATALÁ-BOSCÁ, S., ALCALÁ-VICENTE, C., PÉREZ-MIRALLES, F., LASSMANN, H., & CASANOVA, B. (2021). Potential role of CHI3L1+ astrocytes in progression in MS. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(3). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000972>

DADSETAN, S., BALZANO, T., FORTEZA, J., CABRERA-PASTOR, A., TAORO-GONZALEZ, L., HERNANDEZ-RABAZA, V., GIL-PEROTÍN, S., CUBAS-NÚÑEZ, L., GARCÍA-VERDUGO, J.-M., AGUSTI, A., LLANSOLA, M., & FELIPO, V. (2016). Reducing peripheral inflammation with infliximab reduces neuroinflammation and improves cognition in rats with hepatic encephalopathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00106>

DE CEUNINCK, F., GAUFILLIER, S., BONNAUD, A., SABATINI, M., LESUR, C., & PASTOUREAU, P. (2001). YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(4), 926–931. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5253>

DI ROSA, M., & MALAGUARNERA, L. (2016). Chitinase 3 like-1: An emerging molecule involved in diabetes and diabetic complications. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 83(5), 228–242. <https://doi.org/10.1159/000444855>

DISANTO, G., BARRO, C., BENKERT, P., NAEGELIN, Y., SCHÄDELIN, S., GIARDIELLO, A., ZECCA, C., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., LEPPERT, D., KAPPOS, L., GOBBI, C., KUHLE, J., & SWISS MULTIPLE SCLEROSIS COHORT STUDY GROUP. (2017). Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis: Serum NfL as a Biomarker in MS. *Annals of Neurology*, 81(6), 857–870. <https://doi.org/10.1002/ana.24954>

DU, L., ZHANG, Y., CHEN, Y., ZHU, J., YANG, Y., & ZHANG, H.-L. (2017). Role of microglia in neurological disorders and their potentials as a therapeutic target. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 7567–7584. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0245-0>

- ENRÍQUEZ-DE-SALAMANCA, A., CASTELLANOS, E., STERN, M. E., FERNÁNDEZ, I., CARREÑO, E., GARCÍA-VÁZQUEZ, C., HERRERAS, J. M., & CALONGE, M. (2010). Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Molecular Vision*, *16*, 862–873. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20508732/>
- FIALOVÁ, L., BARTOS, A., SVARCOVÁ, J., ZIMOVA, D., KOTOUCOVA, J., & MALBOHAN, I. (2013). Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *262*(1–2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.06.010>
- FLORO, S., CARANDINI, T., PIETROBONI, A. M., DE RIZ, M. A., SCARPINI, E., & GALIMBERTI, D. (2022). Role of chitinase 3-like 1 as a biomarker in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *9*(4). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001164>
- FRANCIOTTA, D., ZARDINI, E., RAVAGLIA, S., PICCOLO, G., ANDREONI, L., BERGAMASCHI, R., ROMANI, A., TAVAZZI, E., NALDI, P., CERONI, M., & MARCHIONI, E. (2006). Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis. *Journal of the Neurological Sciences*, *247*(2), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.05.049>
- FRISONI, G. B., BOCCARDI, M., BARKHOF, F., BLENNOW, K., CAPPA, S., CHIOTIS, K., DÉMONET, J.-F., GARIBOTTO, V., GIANNAKOPOULOS, P., GIETL, A., HANSSON, O., HERHOLZ, K., JACK, C. R., JR, NOBILI, F., NORDBERG, A., SNYDER, H. M., TEN KATE, M., VARRONE, A., ALBANESE, E., ... WINBLAD, B. (2017). Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *Lancet Neurology*, *16*(8), 661–676. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30159-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30159-X)
- GAIOTTINO, J., NORNGREN, N., DOBSON, R., TOPPING, J., NISSIM, A., MALASPINA, A., BESTWICK, J. P., MONSCH, A. U., REGENITER, A., LINDBERG, R. L., KAPPOS, L., LEPPERT, D., PETZOLD, A., GIOVANNONI, G., & KUHLE, J. (2013). Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One*, *8*(9), e75091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075091>
- GANDHI, R., LARONI, A., & WEINER, H. L. (2010). Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *221*(1–2), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.10.015>
- GHARBIYA, M., VISIOLI, G., TREBBASTONI, A., ALBANESE, G. M., COLARDO, M., D'ANTONIO, F., SEGATTO, M., & LAMBIASE, A. (2023). Beta-amyloid peptide in tears: An early diagnostic marker of Alzheimer's disease correlated with choroidal thickness. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2590. <https://doi.org/10.3390/ijms24032590>
- GIANNETTI, P., POLITIS, M., SU, P., TURKHEIMER, F., MALIK, O., KEIHANINEJAD, S., WU, K., REYNOLDS, R., NICHOLAS, R., & PICCINI, P. (2014). Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive

patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiology of Disease*, 65, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.018>

GIL-PEROTIN, S., CASTILLO-VILLALBA, J., CUBAS-NUÑEZ, L., GASQUE, R., HERVAS, D., GOMEZ-MATEU, J., ALCALA, C., PEREZ-MIRALLES, F., GASCON, F., DOMINGUEZ, J. A., & CASANOVA, B. (2019). Combined cerebrospinal fluid neurofilament light chain protein and chitinase-3 like-1 levels in defining disease course and prognosis in multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 10, 1008. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01008>

HAGAN, S., MARTIN, E., & ENRÍQUEZ-DE-SALAMANCA, A. (2016). Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *The EPMA Journal*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0065-3>

HAKALA, B. E., WHITE, C., & RECKLIES, A. D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(34), 25803–25810. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74461-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74461-5)

HALL, S., SUROVA, Y., ÖHRFELT, A., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., HANSSON, O., & THE SWEDISH BIOFINDER STUDY. (2016). Longitudinal measurements of cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease: Longitudinal CSF biomarkers IN PD. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 31(6), 898–905. <https://doi.org/10.1002/mds.26578>

HENDRICKS, R., BAKER, D., BRUMM, J., DAVANCAZE, T., HARP, C., HERMAN, A., BÜDINGEN, H.-C. VON, TOWNSEND, M., & FISCHER, S. K. (2019). Establishment of neurofilament light chain Simoa assay in cerebrospinal fluid and blood. *Bioanalysis*, 11(15), 1405–1418. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0163>

HINSINGER, G., GALÉOTTI, N., NABHOLZ, N., URBACH, S., RIGAU, V., DEMATTEI, C., LEHMANN, S., CAMU, W., LABAUGE, P., CASTELNOVO, G., BRASSAT, D., LOUSSOUARN, D., SALOU, M., LAPLAUD, D., CASEZ, O., BOCKAERT, J., MARIN, P., & THOUVENOT, E. (2015). Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(10), 1251–1261. <https://doi.org/10.1177/1352458514561906>

HOGENESCH, H., DUNHAM, A., SEYMOUR, R., RENNINGER, M., & SUNDBERG, J. P. (2006). Expression of chitinase-like proteins in the skin of chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm) mice. *Experimental Dermatology*, 15(10), 808–814. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00483.x>

HÜMMERT, M. W., WURSTER, U., BÖNIG, L., SCHWENKENBECHER, P., SÜHS, K.-W., ALVERMANN, S., GINGELE, S., SKRIPULETZ, T., & STANGEL, M. (2019). Investigation of oligoclonal IgG bands in tear fluid of multiple sclerosis patients. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01110>

JANELIDZE, S., MATTSSON, N., STOMRUD, E., LINDBERG, O., PALMQVIST, S., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., & HANSSON, O. (2018). CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer

- JARIUS, S., PAUL, F., WEINSHENKER, B. G., LEVY, M., KIM, H. J., & WILDEMANN, B. (2020). Neuromyelitis optica. *Nature Reviews. Disease Primers*, 6(1), 85. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0214-9>
- JOHANSEN, J. S. (2006). Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Danish Medical Bulletin*, 53(2), 172–209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17087877/>
- KAWADA, M., CHEN, C.-C., ARIHIRO, A., NAGATANI, K., WATANABE, T., & MIZOGUCHI, E. (2008). Chitinase 3-like-1 enhances bacterial adhesion to colonic epithelial cells through the interaction with bacterial chitin-binding protein. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 88(8), 883–895. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.47>
- KAZAKOVA, M. H., & SARAFIAN, V. S. (2009). YKL-40--a novel biomarker in clinical practice? *Folia Medica*, 51(1), 5–14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19437893/>
- KOBELT, G., THOMPSON, A., BERG, J., GANNEDAHL, M., ERIKSSON, J., THE MSCOI STUDY GROUP, & THE EUROPEAN MULTIPLE SCLEROSIS PLATFORM. (2017). New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(8), 1123–1136. <https://doi.org/10.1177/1352458517694432>
- KOSTULAS, V. K., LINK, H., & LEFVERT, A. K. (1987). Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Archives of Neurology*, 44(10), 1041–1044. <https://doi.org/10.1001/archneur.1987.00520220043014>
- KRÓL-GRZYMAŁA, A., SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E., FIEDOROWICZ, E., ROZMUS, D., CIEŚLIŃSKA, A., & GRZYBOWSKI, A. (2022). Tear biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's diseases, and multiple sclerosis: Implications for diagnosis (systematic review). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10123. <https://doi.org/10.3390/ijms231710123>
- KUHLE, J., LEPPERT, D., PETZOLD, A., REGENITER, A., SCHINDLER, C., MEHLING, M., ANTHONY, D. C., KAPPOS, L., & LINDBERG, R. L. P. (2011). Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*, 76(14), 1206–1213. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821432ff>
- KUHLE, JENS, BARRO, C., ANDREASSON, U., DERFUSS, T., LINDBERG, R., SANDELIUS, Å., LIMAN, V., NORGREN, N., BLENNOW, K., & ZETTERBERG, H. (2016). Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(10), 1655–1661. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-1195>
- KUHLE, JENS, KROPSHOFER, H., HAERING, D. A., KUNDU, U., MEINERT, R., BARRO, C., DAHLKE, F., TOMIC, D., LEPPERT, D., & KAPPOS, L. (2019). Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and

treatment response. *Neurology*, 92(10), e1007–e1015.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007032>

KUHLE, JENS, NOURBAKHS, B., GRANT, D., MORANT, S., BARRO, C., YALDIZLI, Ö., PELLETIER, D., GIOVANNONI, G., WAUBANT, E., & GNANAPAVAN, S. (2017). Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology*, 88(9), 826–831.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000003653>

KUIZENGA, A., STOLWIJK, T. R., VAN AGTMAAL, E. J., VAN HAERINGEN, N. J., & KIJLTRA, A. (1990). Detection of secretory IgM in tears of IgA deficient individuals. *Current Eye Research*, 9(10), 997–1005.
<https://doi.org/10.3109/02713689009069936>

LEE, C. G., DA SILVA, C. A., DELA CRUZ, C. S., AHANGARI, F., MA, B., KANG, M.-J., HE, C.-H., TAKYAR, S., & ELIAS, J. A. (2011). Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 479–501.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142250>

LIM, E. T., SELLEBJERG, F., JENSEN, C. V., ALTMANN, D. R., GRANT, D., KEIR, G., THOMPSON, E. J., & GIOVANNONI, G. (2005). Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 11(5), 532–536.
<https://doi.org/10.1191/1352458505ms1218oa>

LING, H., & RECKLIES, A. D. (2004). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical Journal*, 380(Pt 3), 651–659. <https://doi.org/10.1042/BJ20040099>

LINK, H., & HUANG, Y.-M. (2006). Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology*, 180(1–2), 17–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.006>

LLORENS, F., THÜNE, K., TAHIR, W., KANATA, E., DIAZ-LUCENA, D., XANTHOPOULOS, K., KOVATSI, E., PLESCHKA, C., GARCIA-ESPARCIA, P., SCHMITZ, M., OZBAY, D., CORREIA, S., CORREIA, Â., MILOSEVIC, I., ANDRÉOLETTI, O., FERNÁNDEZ-BORGES, N., VORBERG, I. M., GLATZEL, M., SKLAVIADIS, T., ... ZERR, I. (2017). YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 83.
<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0226-4>

LOLLI, F., & FRANCIOTTA, D. (2010). Oligoclonal bands in tears. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 16(6), 760; author reply 761.
<https://doi.org/10.1177/1352458510367663>

LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C., & NATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS SOCIETY (USA) ADVISORY COMMITTEE ON CLINICAL TRIALS OF NEW AGENTS IN MULTIPLE SCLEROSIS*. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*, 46(4), 907–911.
<https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>

- LYCKE, J. N., KARLSSON, J. E., ANDERSEN, O., & ROSENGREN, L. E. (1998). Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 64(3), 402–404. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.3.402>
- MAGRANER, M. J., BOSCA, I., SIMÓ-CASTELLÓ, M., GARCÍA-MARTÍ, G., ALBERICH-BAYARRI, A., CORET, F., ALVAREZ-CERMEÑO, J. C., MARTÍ-BONMATÍ, L., VILLAR, L. M., & CASANOVA, B. (2012). Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology*, 54(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s00234-011-0841-7>
- MAHAD, D. J., LAWRY, J., HOWELL, S. J. L., & WOODROOFE, M. N. (2003). Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 9(2), 189–198. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms899oa>
- MALMESTRÖM, C., AXELSSON, M., LYCKE, J., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., & OLSSON, B. (2014). CSF levels of YKL-40 are increased in MS and replaces with immunosuppressive treatment. *Journal of Neuroimmunology*, 269(1–2), 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.004>
- MANOUCHEHRINIA, A., STRIDH, P., KHADEMI, M., LEPPERT, D., BARRO, C., MICHALAK, Z., BENKERT, P., LYCKE, J., ALFREDSSON, L., KAPPOS, L., PIEHL, F., OLSSON, T., KUHLE, J., & KOCKUM, I. (2020). Plasma neurofilament light levels are associated with risk of disability in multiple sclerosis. *Neurology*, 94(23), e2457–e2467. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009571>
- MAÑÉ-MARTÍNEZ, M. A., OLSSON, B., BAU, L., MATAS, E., COBO-CALVO, Á., ANDREASSON, U., BLENNOW, K., ROMERO-PINEL, L., MARTÍNEZ-YÉLAMOS, S., & ZETTERBERG, H. (2016). Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid in different types of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 299, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.08.004>
- MATSUSHITA, T., TATEISHI, T., ISOBE, N., YONEKAWA, T., YAMASAKI, R., MATSUSE, D., MURAI, H., & KIRA, J.-I. (2013). Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PloS One*, 8(4), e61835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061835>
- MAVRA, M., THOMPSON, E. J., NIKOLIC, J., KRUNIC, A., RANIN, J., LEVIC, Z., KEIR, G., LUXTON, R., & YOUL, B. D. (1990). The occurrence of oligoclonal IgG in tears from patients with MS and systemic immune disorders. *Neurology*, 40(8), 1259–1262. <https://doi.org/10.1212/wnl.40.8.1259>
- MILLER, D., BARKHOF, F., MONTALBAN, X., THOMPSON, A., & FILIPPI, M. (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurology*, 4(5), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70071-5)

- MILLER, J., & ULRICH, R. (2019). The quest for an optimal alpha. *PloS One*, 14(1), e0208631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208631>
- MIZOGUCHI, E. (2006). Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 130(2), 398–411. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.007>
- MODVIG, S., DEGN, M., SANDER, B., HORWITZ, H., WANSCHER, B., SELLEBJERG, F., & FREDERIKSEN, J. L. (2016). Cerebrospinal fluid neurofilament light chain levels predict visual outcome after optic neuritis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 22(5), 590–598. <https://doi.org/10.1177/1352458515599074>
- MURUBE, J. (2009). Basal, reflex, and psycho-emotional tears. *The Ocular Surface*, 7(2), 60–66. [https://doi.org/10.1016/s1542-0124\(12\)70296-3](https://doi.org/10.1016/s1542-0124(12)70296-3)
- NANDI, S. K., SINGH, D., UPADHAY, J., GUPTA, N., DHIMAN, N., MITTAL, S. K., & MAHINDROO, N. (2021). Identification of tear-based protein and non-protein biomarkers: Its application in diagnosis of human diseases using biosensors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193(Pt A), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.198>
- NICHOLS, J. J., & GREEN-CHURCH, K. B. (2009). Mass spectrometry-based proteomic analyses in contact lens-related dry eye. *Cornea*, 28(10), 1109–1117. <https://doi.org/10.1097/ico.0b013e3181a2ad81>
- NORGREN, N., SUNDSTRÖM, P., SVENNINGSSON, A., ROSENGREN, L., STIGBRAND, T., & GUNNARSSON, M. (2004). Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology*, 63(9), 1586–1590. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000142988.49341.d1>
- NOSEWORTHY, J. H., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M., & WEINSHENKER, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 343(13), 938–952. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431307>
- NOVAKOVA, L., AXELSSON, M., KHADEMI, M., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., MALMESTRÖM, C., PIEHL, F., OLSSON, T., & LYCKE, J. (2017A). Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 141(2), 296–304. <https://doi.org/10.1111/jnc.13881>
- NOVAKOVA, L., AXELSSON, M., KHADEMI, M., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., MALMESTRÖM, C., PIEHL, F., OLSSON, T., & LYCKE, J. (2017B). Cerebrospinal fluid biomarkers of inflammation and degeneration as measures of fingolimod efficacy in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(1), 62–71. <https://doi.org/10.1177/1352458516639384>
- NOVAKOVA, L., AXELSSON, M., MALMESTRÖM, C., IMBERG, H., ELIAS, O., ZETTERBERG, H., NERMAN, O., & LYCKE, J. (2018). Searching for neurodegeneration in multiple sclerosis at clinical onset: Diagnostic value of biomarkers. *PloS One*, 13(4), e0194828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194828>

- NOVAKOVA, L., ZETTERBERG, H., SUNDSTRÖM, P., AXELSSON, M., KHADEMI, M., GUNNARSSON, M., MALMESTRÖM, C., SVENNINGSSON, A., OLSSON, T., PIEHL, F., BLENNOW, K., & LYCKE, J. (2017). Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*, *89*(22), 2230–2237. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004683>
- OBER, C., TAN, Z., SUN, Y., POSSICK, J. D., PAN, L., NICOLAE, R., RADFORD, S., PARRY, R. R., HEINZMANN, A., DEICHMANN, K. A., LESTER, L. A., GERN, J. E., LEMANSKE, R. F., JR, NICOLAE, D. L., ELIAS, J. A., & CHUPP, G. L. (2008). Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *The New England Journal of Medicine*, *358*(16), 1682–1691. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708801>
- ÖRNEK, N., DAĞ, E., & ÖRNEK, K. (2015). Corneal sensitivity and tear function in neurodegenerative diseases. *Current Eye Research*, *40*(4), 423–428. <https://doi.org/10.3109/02713683.2014.930154>
- OZAKBAS, S., CINAR, B. P., ÖZCELİK, P., BASER, H., & KOSEHASANOĞULLARI, G. (2017). Intrathecal IgM index correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *160*, 27–29. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.05.026>
- PARK, H. Y., JUN, C.-D., JEON, S.-J., CHOI, S.-S., KIM, H.-R., CHOI, D.-B., KWAK, S., LEE, H.-S., CHEONG, J. S., SO, H.-S., LEE, Y.-J., & PARK, D.-S. (2012). Serum YKL-40 levels correlate with infarct volume, stroke severity, and functional outcome in acute ischemic stroke patients. *PLoS One*, *7*(12), e51722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051722>
- PAUL, A., COMABELLA, M., & GANDHI, R. (2019). Biomarkers in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(3), a029058. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029058>
- PÉREZ-MIRALLES, F., PREFASI, D., GARCÍA-MERINO, A., GASCÓN-GIMÉNEZ, F., MEDRANO, N., CASTILLO-VILLALBA, J., CUBAS, L., ALCALÁ, C., GIL-PEROTÍN, S., GÓMEZ-BALLESTEROS, R., MAURINO, J., ÁLVAREZ-GARCÍA, E., & CASANOVA, B. (2020). CSF chitinase 3-like-1 association with disability of primary progressive MS. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *7*(5), e815. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000815>
- PETZOLD, A., STEENWIJK, M. D., EIKELENBOOM, J. M., WATTJES, M. P., & UITDEHAAG, B. M. (2016). Elevated CSF neurofilament proteins predict brain atrophy: A 15-year follow-up study. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *22*(9), 1154–1162. <https://doi.org/10.1177/1352458516645206>
- PIERAGOSTINO, D., LANUTI, P., CICALINI, I., CUFARO, M. C., CICCOCIOPPO, F., RONCI, M., SIMEONE, P., ONOFRJ, M., VAN DER POL, E., FONTANA, A., MARCHISIO, M., & DEL BOCCIO, P. (2019). Proteomics characterization of extracellular vesicles sorted by flow cytometry reveals a disease-specific molecular cross-talk from cerebrospinal fluid and tears in multiple sclerosis. *Journal of Proteomics*, *204*(103403), 103403. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103403>
- PRANZATELLI, M. R., TATE, E. D., HOEFGEN, E. R., SWAN, J. A., & COLLIVER, J. A. (2008). Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating

factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Cytokine*, 44(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.06.001>

PUGLIATTI, M., ROSATI, G., CARTON, H., RIISE, T., DRULOVIC, J., VECSEI, L., & MILANOV, I. (2006). The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 13(7), 700–722. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x>

PUIG, E. C. (2014). Búsqueda de biomarcadores asociados a la conversión a esclerosis múltiple en pacientes con síndromes clínicos aislados. Universitat Autònoma de Barcelona.

QUAH, J. H. M., TONG, L., & BARBIER, S. (2014). Patient acceptability of tear collection in the primary healthcare setting. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 91(4), 452–458. <https://doi.org/10.1097/OPX.000000000000188>

QUEROL-VILASECA, M., COLOM-CADENA, M., PEGUEROLES, J., SAN MARTÍN-PANIELLO, C., CLARIMON, J., BELBIN, O., FORTEA, J., & LLEÓ, A. (2017). YKL-40 (Chitinase 3-like I) is expressed in a subset of astrocytes in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0893-7>

QUINTANA, E., COLL, C., SALAVEDRA-PONT, J., MUÑOZ-SAN MARTÍN, M., ROBLES-CEDENO, R., TOMÀS-ROIG, J., BUXÓ, M., MATUTE-BLANCH, C., VILLAR, L. M., MONTALBAN, X., COMABELLA, M., PERKAL, H., GICH, J., & RAMIÓ-TORRENTÀ, L. (2018). Cognitive impairment in early stages of multiple sclerosis is associated with high cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1111/ene.13687>

RATHCKE, C. N., JOHANSEN, J. S., & VESTERGAARD, H. (2006). YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Et al [Inflammation Research]*, 55(2), 53–59. <https://doi.org/10.1007/s00011-005-0010-8>

RECKLIES, A. D., WHITE, C., & LING, H. (2002). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *The Biochemical Journal*, 365(Pt 1), 119–126. <https://doi.org/10.1042/BJ20020075>

REHLI, M., NILLER, H.-H., AMMON, C., LANGMANN, S., SCHWARZFISCHER, L., ANDREESEN, R., & KRAUSE, S. W. (2003). Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44058–44067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306792200>

RENTKA, A., *KOROSKENYI, K., HARSFALVI, J., SZEKANECZ, Z., SZUCS, G., SZODORAY, P., & KEMENY-BEKE, A. (2017). Evaluation of commonly used tear sampling methods and their relevance in subsequent biochemical

analysis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 54(5), 521–529.
<https://doi.org/10.1177/0004563217695843>

SALVISBERG, C., TAJOURI, N., HAINARD, A., BURKHARD, P. R., LALIVE, P. H., & TURCK, N. (2014). Exploring the human tear fluid: discovery of new biomarkers in multiple sclerosis. *Proteomics. Clinical Applications*, 8(3–4), 185–194.
<https://doi.org/10.1002/prca.201300053>

SANFILIPPO, C., LONGO, A., LAZZARA, F., CAMBRIA, D., DISTEFANO, G., PALUMBO, M., CANTARELLA, A., MALAGUARNERA, L., & DI ROSA, M. (2017). CHI3L1 and CHI3L2 overexpression in motor cortex and spinal cord of sALS patients. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 85, 162–169.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.10.001>

SEIFERT, K., GANDIA, N. C., WILBURN, J. K., BOWER, K. S., SIA, R. K., RYAN, D. S., DEATON, M. L., STILL, K. M., VASSILEV, V. C., LAURIE, G. W., & MCKOWN, R. L. (2012). Tear lacritin levels by age, sex, and time of day in healthy adults. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(10), 6610–6616.
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-8729>

SELLEBJERG, F., BÖRNSEN, L., KHADEMI, M., KRAKAUER, M., OLSSON, T., FREDERIKSEN, J. L., & SØRENSEN, P. S. (2009). Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology*, 73(23), 2003–2010. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c5b457>

SELLEBJERG, FINN, BÖRNSEN, L., AMMITZBØLL, C., NIELSEN, J. E., VINTHER-JENSEN, T., HJERMIND, L. E., VON ESSEN, M., RATZER, R. L., SOELBERG SØRENSEN, P., & ROMME CHRISTENSEN, J. (2017). Defining active progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(13), 1727–1735. <https://doi.org/10.1177/1352458517726592>

SHACKELTON, L. M., MANN, D. M., & MILLIS, A. J. (1995). Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13076–13083.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13076>

SHUMWAY, C. L., PATEL, B. C., & DE JESUS, O. (2023). Neuromyelitis Optica (NMO, Devics Disease). StatPearls Publishing.

SILLER, N., KUHLE, J., MUTHURAMAN, M., BARRO, C., UPHAUS, T., GROPPA, S., KAPPOS, L., ZIPP, F., & BITTNER, S. (2019). Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 25(5), 678–686. <https://doi.org/10.1177/1352458518765666>

SONODA, S., UCHINO, E., NAKAO, K., & SAKAMOTO, T. (2006). Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. *The British Journal of Ophthalmology*, 90(1), 120–122.
<https://doi.org/10.1136/bjo.2005.076737>

SORIA, J., DURÁN, J. A., ETXEBARRIA, J., MERAYO, J., GONZÁLEZ, N., REIGADA, R., GARCÍA, I., ACERA, A., & SUÁREZ, T. (2013). Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization

in dry eye and meibomian gland dysfunction. *Journal of Proteomics*, 78, 94–112. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.11.017>

SUN, Y. J., CHANG, N. C., HUNG, S. I., CHANG, A. C., CHOU, C. C., & HSIAO, C. D. (2001). The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17507–17514. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010416200>

TALAAT, F., ABDELATY, S., RAGAIE, C., & DAHSHAN, A. (2023). Chitinase-3-like 1-protein in CSF: a novel biomarker for progression in patients with multiple sclerosis. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1007/s10072-023-06764-2>

TEUNISSEN, C. E., IACOBAEUS, E., KHADEMI, M., BRUNDIN, L., NORGRÉN, N., KOEL-SIMMELINK, M. J. A., SCHEPENS, M., BOUWMAN, F., TWAALFHOVEN, H. A. M., BLOM, H. J., JAKOBS, C., & DIJKSTRA, C. D. (2009). Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*, 72(15), 1322–1329. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a0fe3f>

THOMPSON, A. G., GRAY, E., BAMPTON, A., RACIBORSKA, D., TALBOT, K., & TURNER, M. R. (2019). CSF chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(11), 1215–1220. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-320442>

THOMPSON, A. J., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CARROLL, W. M., COETZEE, T., COMI, G., CORREALE, J., FAZEKAS, F., FILIPPI, M., FREEDMAN, M. S., FUJIHARA, K., GALETTA, S. L., HARTUNG, H. P., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MARRIE, R. A., MILLER, A. E., MILLER, D. H., MONTALBAN, X., ... COHEN, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30470-2)

TSUBOTA, K., PFLUGFELDER, S. C., LIU, Z., BAUDOUIN, C., KIM, H. M., MESSMER, E. M., KRUSE, F., LIANG, L., CARRENO-GALEANO, J. T., ROLANDO, M., YOKOI, N., KINOSHITA, S., & DANA, R. (2020). Defining dry eye from a clinical perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9271. <https://doi.org/10.3390/ijms21239271>

TULLMAN, M. J., OSHINSKY, R. J., LUBLIN, F. D., & CUTTER, G. R. (2004). Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 10(4), 451–454. <https://doi.org/10.1191/1352458504ms1059oa>

VERSURA, P., NANNI, P., BAVELLONI, A., BLALOCK, W. L., PIAZZI, M., RODA, A., & CAMPOS, E. C. (2010). Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye*, 24(8), 1396–1402. <https://doi.org/10.1038/eye.2010.7>

VILLAR, L. M., MASJUAN, J., GONZÁLEZ-PORQUÉ, P., PLAZA, J., SÁDABA, M. C., ROLDÁN, E., BOOTELLO, A., & ALVAREZ-CERMEÑO, J. C. (2002). Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*, 59(4), 555–559. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.4.555>

- VILLAR, LUISA M., MASJUAN, J., GONZÁLEZ-PORQUÉ, P., PLAZA, J., SÁDABA, M. C., ROLDÁN, E., BOOTELLO, A., & ALVAREZ-CERMEÑO, J. C. (2003). Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis: Intrathecal IgM in MS. *Annals of Neurology*, 53(2), 222–226. <https://doi.org/10.1002/ana.10441>
- VILLAR, LUISA M., SÁDABA, M. C., ROLDÁN, E., MASJUAN, J., GONZÁLEZ-PORQUÉ, P., VILLARRUBIA, N., ESPIÑO, M., GARCÍA-TRUJILLO, J. A., BOOTELLO, A., & ALVAREZ-CERMEÑO, J. C. (2005). Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 187–194. <https://doi.org/10.1172/JCI22833>
- VOLCK, B., PRICE, P. A., JOHANSEN, J. S., SØRENSEN, O., BENFIELD, T. L., NIELSEN, H. J., CALAFAT, J., & BORREGAARD, N. (1998). YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(4), 351–360. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9686683/>
- VU, L., AN, J., KOVALIK, T., GENDRON, T., PETRUCELLI, L., & BOWSER, R. (2020). Cross-sectional and longitudinal measures of chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis and expression of CHI3L1 in activated astrocytes. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 91(4), 350–358. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-321916>
- WOŹNIAK, M., PALUSZKIEWICZ, C., & KWIATEK, W. M. (2019). Saliva as a non-invasive material for early diagnosis. *Acta Biochimica Polonica*, 66(4), 383–388. https://doi.org/10.18388/abp.2019_2762
- YAMOUT, B. I., & ALROUGHANI, R. (2018). Multiple sclerosis. *Seminars in Neurology*, 38(2), 212–225. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1649502>
- ZEYDAN, B., & KANTARCI, O. H. (2018). Progressive forms of multiple sclerosis: Distinct entity or age-dependent phenomena. *Neurologic Clinics*, 36(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.08.006>
- ZHOU, L., & BEUERMAN, R. W. (2017). The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. *Expert Review of Proteomics*, 14(3), 189–191. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1285703>
- ZIEMSEN, T., AKGÜN, K., & BRÜCK, W. (2019). Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1674-2>

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I

8.2 ANEXO II

8.2.1 Protocolo Western blot

8.2.2 Protocolo ELISA

8.2.3 Protocolo IEF para detección de BOM